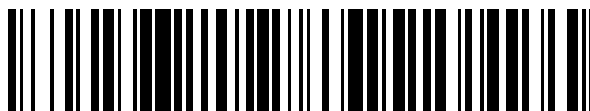


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 330**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/415** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2012 PCT/NL2012/050481**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13006058**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2012 E 12738649 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2731962**

54 Título: **Uso de JAZ5a para mejorar la resistencia a la sequía en una planta**

30 Prioridad:  
**07.07.2011 US 201161505391 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.07.2017**

73 Titular/es:  
**KEYGENE N.V. (100.0%)  
P.O. Box 216  
6700 AE Wageningen, NL**

72 Inventor/es:  
**VAN TUNEN, ADRIANUS, JOHANNES**

74 Agente/Representante:  
**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 627 330 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

Uso de JAZ5a para mejorar la resistencia a la sequía en una planta

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## Campo técnico

[0001] La presente descripción pertenece a los campos de la biotecnología y la botánica. La presente descripción se refiere a un nuevo procedimiento para mejorar la resistencia a la sequía de una planta. La descripción implica el uso de una proteína en dicha planta para mejorar la resistencia a la sequía. La presente descripción se refiere al aumento de la expresión o actividad de la proteína, proporcionando así resistencia mejorada a la sequía a una planta en comparación con una planta no modificada para aumentar la expresión de la proteína.

## 15 Antecedentes de la técnica

[0002] Las coles incluyen principalmente *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* y *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*. *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* también se denomina col verde y *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* bebé en el norte de China. *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* presenta una alta adaptabilidad, crecimiento, productividad y nutrición. Es la verdura más consumida entre las diversas verduras y creció ampliamente en las provincias de las regiones del valle del río Yangtsé en China. Hay varios tipos y variedades de *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*. Las coles tienen un periodo de crecimiento corto, una amplia adaptabilidad y una productividad alta. También son fáciles de plantar, lo que permite un suministro sostenido durante todo el año.

[0003] Los productos de *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* son frescos y tiernos, son ricos en nutrientes y se ganan el favor de los consumidores. *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* comprende alrededor del 30-40 % de la productividad nacional total de verduras al año, y también contribuye de forma importante a la suplementación de verduras en temporadas bajas y a equilibrar el suministro de verduras durante todo un año. Tanto *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* como *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* se ven favorecidas por el clima fresco y se pueden plantar durante todo el año. La temperatura de crecimiento más adecuada es de 15-20 °C. En los últimos años, para satisfacer la demanda del mercado, las coles se plantan principalmente mediante la técnica de cultivo intensivo. Para asegurar una producción y suministro uniforme a lo largo de las cuatro estaciones, *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* generalmente necesita plantarse de diferentes maneras en las diferentes estaciones. En el pasado, *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* se plantaba principalmente en primavera e invierno. Ahora la gente comienza a plantar *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* en el tórrido verano y otoño mediante diversas formas de cultivo. Esto hará indudablemente que *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* se vea sometida al estrés de la sequía durante su crecimiento, especialmente a finales de primavera, verano y principios de otoño.

[0004] La *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* cultivada en las estaciones de temperatura alta puede llegar al mercado a granel después de un cultivo de 20 días. Sin embargo, las altas temperaturas normalmente conducen a un entrenado alargado, crecimiento lento, sabor amargo, fibra indeseablemente aumentada, etc. Esto dará lugar a baja productividad y mala calidad. Como resultado, el precio sube y la oferta no satisface la demanda. No se puede satisfacer la demanda del consumidor. *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* tiene poca tolerancia a la sequía. Es muy sensible a la sequía en la etapa de roseta y la etapa de formación de la cabeza. Si la temperatura media es demasiado alta, la hoja central no puede amplexarse para formar un bulbo apretado, o no puede formar el bulbo en absoluto. Incluso si se forma el bulbo de manera forzada, la cabeza no queda apretada. En las condiciones naturales del campo en verano, la producción se basa en la capacidad de las plantas con resistencia a la sequía de formar una cabeza hojosa normal. Y la capacidad de formación de cogollos a la alta temperatura natural en los campos se convierte en una indicación de una resistencia a la sequía en *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*.

[0005] Tanto la *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* como la *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* se plantaron originalmente en China. En otros países, hay pocos estudios sobre mejoramiento de coles. Las variedades de origen japonés, coreano y formosano tienen una resistencia pobre a la sequía, y no son aptas para plantarse en China. Nacionalmente dominantes son principalmente las variedades resistentes a las enfermedades plantadas en otoño. Las verduras de las coles tienen una genoteca limitada para la resistencia a la sequía. El mejoramiento de variedades de coles con resistencia a la sequía se limita a la criba de entre los materiales de col, por medio de la que solo se han obtenido algunas variedades con una resistencia a la sequía pobre y una baja resistencia al estrés.

[0006] Para resolver estos problemas, los expertos en mejoramiento nacionales han utilizado los

procedimientos de mejoramiento tradicionales para cribar y cultivar variedades con resistencia a la sequía de las verduras de coles, introducir genes de resistencia a la sequía y ampliar las fuentes de explotación, lo que mejoró la capacidad de resistencia a la sequía de las verduras de coles hasta un cierto grado y han tenido efecto en la producción real. Sin embargo, los procedimientos actuales se limitan a la evaluación de la resistencia a la sequía en el clima local y los cambios morfológicos en condiciones de estrés por alta temperatura. Estos procedimientos no son adecuados para las áreas templadas, que no pueden proporcionar las condiciones de campo con estreses por selección adecuados. Incluso si se seleccionara una sola planta con resistencia a la sequía, se requeriría una serie de procedimientos y medios complicados para mantener la resistencia a la sequía en las semillas recogidas hasta la próxima primavera. La criba requiere un periodo de tiempo largo y está limitada geográficamente, lo que no puede proporcionar una variedad resistente a la sequía universalmente adaptable. Por lo tanto, es una tarea urgente en el mejoramiento de verduras de coles con resistencia a la sequía estudiar intensamente la ocurrencia y desarrollo de los daños durante la etapa de plántula y desarrollar un procedimiento y una técnica para cribar la resistencia a la sequía en la etapa de plántula, que proporcione operatividad, estabilidad, eficiencia y adaptabilidad mejoradas. Los rasgos estrechamente asociados con la resistencia a la sequía en coles son de naturaleza cuantitativa, lo que plantea grandes dificultades en la genotipificación. Particularmente para el mejoramiento molecular, las dificultades incluyen no solo el número limitado de marcadores de ADN útiles en la selección auxiliar, sino también la inconsistencia del número y la importancia de los loci de rasgos cuantitativos (QTL). Por lo tanto, puesto que la secuenciación del genoma de las coles aún no se ha terminado, y el estudio sobre el estudio funcional del genoma está ganando intereses cada vez mayores, es necesario un análisis cualitativo rápido, sensible y eficiente sobre los diversos rasgos en la planta y los perfiles de ADN, y un análisis cuantitativo sobre los fenotipos en las plantas y los cambios en las expresiones génicas, que es útil en el mejoramiento de coles con resistencia a la sequía.

**[0007]** Existe una necesidad en la técnica para identificar genes de resistencia a la sequía en plantas.

## 25 Resumen de la invención

**[0008]** Es un objetivo de la presente invención proporcionar resistencia a la sequía en una planta. Con plantas provistas de resistencia a la sequía o plantas con una resistencia a la sequía mejorada es, por ejemplo, posible obtener mayores rendimientos de cultivo y/o producto vegetal cuando la planta se somete a un periodo o periodos de sequía en comparación con plantas no provistas de resistencia (mejorada) a la sequía. Se encontró que a una planta se le puede proporcionar con una resistencia (mejorada) a la sequía cuando se aumenta la expresión en dicha planta de un gen JAZ5a. Por lo tanto, la presente invención proporciona usos del gen JAZ5a para proporcionar resistencia (mejorada) a la sequía. Otros aspectos de la presente invención serán evidentes para el experto en la materia basándose en los contenidos descritos en este documento.

## 35 Descripción de los dibujos

**[0009]**

La figura 1 muestra los síntomas de marchitez 15 DOD y en adelante, a las plantas se les dio diariamente una puntuación entre 0 y 4 (eje y) sobre la base de los síntomas de marchitez que presentaron. Los síntomas de marchitez se expresaron como 0, sin síntomas; 1, pérdida muy leve de turgencia; 2, pérdida de turgencia; 3, pérdida severa de turgencia; 4, aparentemente muerta. El asterisco rojo indica diferencias estadísticas en la puntuación de marchitez entre plantas mutantes y plantas de tipo salvaje (prueba t de Student;  $\alpha < 0,05$ ). El asterisco negro en la leyenda indica heterocigosidad de la línea. Cada gráfica representa una bandeja individual. La figura 2 muestra un efecto representativo de rehidratación una semana después de la rehidratación a 19 DOD o 20 DOD, comparando plantas de tipo salvaje con plantas 35:BcpJAZ5a. Claramente, las plantas 35:BcpJAZ5a tienen mejor rendimiento que las plantas de tipo salvaje.

## 50 Definiciones

**[0010]** En la siguiente descripción y ejemplos, se usan una serie de términos. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y coherente de la especificación y las reivindicaciones, incluido el alcance a ser dado a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones. A menos que se defina de otro modo en este documento, todos los términos técnicos y científicos usados tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

**[0011]** Los procedimientos para llevar a cabo las técnicas convencionales usadas en los procedimientos de la invención serán evidentes para el experto en la materia. La práctica de técnicas convencionales en biología

molecular, bioquímica, química computacional, cultivo celular, ADN recombinante, bioinformática, genómica, secuenciación y campos relacionados son bien conocidas por los expertos en la materia y se discuten, por ejemplo, en las siguientes referencias bibliográficas: Sambrook y col., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2.<sup>a</sup> edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas; y la serie *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego.

10 **[0012]** En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo «comprender» y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los artículos que siguen a la palabra están incluidos, pero los artículos no mencionados específicamente no están excluidos. Tal como se usa en este documento, el término «que comprende», «que tiene» o «que contiene» incluye «que comprende», «constituido sustancialmente por», «constituido esencialmente por» y «constituido por». «Constituido sustancialmente por», «constituido esencialmente por» y «constituido por» son conceptos específicos de los términos genéricos «que comprende», «que tiene» y «que contiene».

15 **[0013]** Tal como se usan en este documento, las formas singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, un procedimiento para aislar «una» molécula de ADN, como se usó anteriormente, incluye el aislamiento de una pluralidad de moléculas (por ejemplo, decenas, cientos, miles, decenas de miles, cientos de miles, millones o más moléculas).

20 **[0014]** El término «polinucleótido», «molécula de ácido nucleico» o «secuencia de ácido nucleico» se refiere a una molécula de ADN o ARN en forma de cadena simple o doble, particularmente un ADN que codifica una proteína de acuerdo con la invención. Una «secuencia de ácido nucleico aislada» se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ya no está en el ambiente natural del que se aisló, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped bacteriana o en el genoma nuclear o plasmídico de la planta. Por ejemplo, un polinucleótido y un polipéptido en un estado natural en la célula viva no están aislados o purificados. Sin embargo, cuando el mismo polinucleótido o polipéptido está separado de las otras sustancias con las que coexiste en dicho estado natural, se denomina «aislado» y/o «purificado».

30 **[0015]** Alineación y alineamiento: Con el término «alineación» y «alineamiento» se entiende la comparación de dos o más secuencias de nucleótidos basadas en la presencia de tramos cortos o largos de nucleótidos idénticos o similares. En la técnica se conocen varios procedimientos para el alineamiento de secuencias de nucleótidos, como se explicará más adelante a más abajo.

35 **[0016]** La «expresión de un gen» se refiere al procedimiento en el que una región de ADN, que está unida operativamente a regiones reguladoras apropiadas, particularmente un promotor, se transcribe en un ARN, que es biológicamente activo, por ejemplo, que es capaz de traducirse en una proteína o péptido biológicamente activo o un fragmento de un péptido activo. Una proteína activa, en ciertas realizaciones, se refiere a una proteína que es constitutivamente activa. La secuencia de codificación está preferentemente en orientación sentido y codifica una proteína o péptido biológicamente activo deseado o un fragmento de péptido activo.

45 **[0017]** «Funcional», en relación con las proteínas (o variantes, tales como ortólogas o mutantes, y fragmentos), se refiere a la capacidad de un gen y/o proteína codificada para tener un efecto sobre una característica(s) cuantitativa y/o cualitativa de una planta. Al modificar el nivel de expresión del gen (por ejemplo, aumentando la expresión o reduciendo la expresión) se ve afectada la característica cuantitativa y/o cualitativa de una planta. Por ejemplo, cuando una proteína tiene una función en la resistencia a la sequía, aumentar la expresión génica puede conducir a la resistencia a la sequía. El experto en la materia no tendrá dificultades para probar la funcionalidad con respecto a estreses abióticos tales como sequía.

50 **[0018]** El término «gen» significa una secuencia de ADN que comprende una región (región transcrita), que se transcribe en una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm) en una célula, unida operativamente a las regiones reguladoras apropiadas (por ejemplo, un promotor). Por lo tanto, un gen puede comprender varias secuencias unidas operativamente, tales como un promotor, una secuencia líder 5' que comprende, por ejemplo, secuencias implicadas en el inicio de la traducción, una región codificante (de la proteína) (ADNc o ADN genómico) y una secuencia 3' no traducida que comprende, por ejemplo, sitios de secuencia de terminación de la transcripción. Un «gen quimérico» (o gen recombinante) se refiere a cualquier gen, que normalmente no se encuentra naturalmente en una especie, en particular un gen en el que están presentes una o más partes de la secuencia de ácido nucleico que no están asociadas entre sí naturalmente. Por ejemplo, el promotor no está asociado naturalmente con parte o la totalidad de la región transcrita ni con otra región reguladora. Se entiende que el término «gen quimérico» incluye

construcciones de expresión en las que un promotor o una secuencia reguladora de la transcripción está unida operativamente a una o más secuencias codificantes o a una secuencia antisentido (complemento inverso de la cadena sentido) o secuencia de repeticiones invertidas (sentido y antisentido, por lo que el transcrito de ARN forma ARN de cadena doble tras la transcripción).

5

**[0019]** «Identidad» es una medida de la identidad de secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos. En general, las secuencias están alineadas de modo que se obtiene la coincidencia de orden más alto. La «identidad» *per se* tiene un significado reconocido en la técnica y puede calcularse usando técnicas publicadas. Véase, por ejemplo: (COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana; SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y SEQUENCE ANALYSIS PRIMER; Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). Aunque existen varios procedimientos para medir la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, el término «identidad» es bien conocido por los expertos en la materia (Carillo, H., y Lipton, D., SIAM J. Applied Math (1988) 48:1073). Los procedimientos comúnmente empleados para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin estar limitados a estos, los descritos en GUIDE TO HUGE COMPUTERS, Martin J. Bishop, ed. Academic Press, San Diego, 1994, y Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math (1988) 48:1073. Los procedimientos para determinar la identidad y la similitud se codifican en programas informáticos. Los procedimientos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin estar limitados a estos, el paquete de programas GCS (Devereux, J. y col., Nucleic Acids Research (1984) 12 (1): 387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. (1990) 215:403).

**[0020]** Como una ilustración, por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos, por ejemplo, 95 % de «identidad» con una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica un polipéptido de una cierta secuencia, se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de polipéptidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta el 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede suprimirse y/o sustituirse por otro nucleótido, y/o un número de nucleótidos hasta el 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

**[0021]** De forma similar, por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos, por ejemplo, 95 % de «identidad» con una secuencia de aminoácidos de referencia de ID DE SECUENCIA N.º 1, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido sea idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de polipéptidos puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos del aminoácido de referencia de ID DE SECUENCIA N.º 1. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta el 5 % de los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia puede suprimirse o sustituirse por otro aminoácido, o un número de aminoácidos hasta el 5 % de los residuos de aminoácidos totales en la secuencia de referencia puede insertarse en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones terminales amino o carboxilo de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

**[0022]** Un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede incluir cualquier polímero u oligómero de bases de pirimidina y purina, preferentemente citosina, timina y uracilo, y adenina y guanina, respectivamente (véase Albert L. Lehninger, Principles of Biochemistry, at 793-800 (Worth Pub. 1982). La presente invención contempla cualquier componente de ácido nucleico de desoxirribonucleótido, ribonucleótido o péptido, y cualquier variante química de los mismos, tales como formas metiladas, hidroximetiladas o glicosiladas de estas bases, y similares. Los polímeros u oligómeros pueden ser de composición heterogénea u homogénea, y pueden aislarse a partir de fuentes naturales o pueden producirse artificial o sintéticamente. Además, los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, o una mezcla de los mismos, y pueden existir de forma permanente o transicional en forma de cadena simple o cadena doble, incluidos los estados homodúplex, heterodúplex e híbridos.

**[0023]** Como se usa en este documento, el término «unido operativamente» se refiere a un enlace de elementos de polinucleótidos en una relación funcional. Un ácido nucleico está «unido operativamente» cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o, mejor dicho, una secuencia reguladora de la transcripción, está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Unido operativamente significa que las secuencias de ADN que se unen son típicamente contiguas y, cuando es necesario para unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en el marco de lectura para producir una «proteína quimérica». Una «proteína quimérica» o «proteína híbrida» es una proteína compuesta por diversos «dominios» (o motivos) de la proteína que no se encuentran como tales naturalmente pero que están unidos para formar una proteína funcional, que muestra la funcionalidad de los dominios unidos. Una proteína quimérica también puede ser una proteína de fusión de dos o más proteínas naturales. El término «dominio» tal como se usa en este documento significa cualquier parte(s) o dominio(s) de la proteína con una estructura o función específica que se puede transferir a otra proteína para proporcionar una nueva proteína híbrida con al menos la característica funcional del dominio.

**[0024]** «Planta» se refiere a la planta entera o a partes de una planta, tales como células, tejidos u órganos (por ejemplo, polen, semillas, gametos, raíces, hojas, flores, botones florales, anteras, frutos, etc.) obtenibles de la planta, así como los derivados de cualquiera de ellos y la progenie derivada de tal planta por autofecundación o cruce. «Célula(s) vegetal» incluye protoplastos, gametos, cultivos en suspensión, microesporas, granos de polen, etc., ya sea aisladamente o dentro de un tejido, órgano u organismo.

**[0025]** Tal como se usa en este documento, el término «promotor» se refiere a un fragmento de ácido nucleico que tiene como función controlar la transcripción de uno o más genes localizados corriente arriba con respecto a la dirección de transcripción del sitio de inicio de la transcripción del gen, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para ARN polimerasa dependiente de ADN, sitios de inicio de transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluidos, pero sin limitarse a estos, sitios de unión al factor de transcripción, sitios de unión a proteínas represoras y activadoras y cualquier otra secuencia de nucleótidos que el experto en la materia sabe que actúan directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor. Opcionalmente, el término «promotor» incluye en este documento también la región 5' UTR (región no traducida de 5') (por ejemplo, el promotor puede incluir en este documento una o más partes corriente arriba (5') del codón de inicio de la traducción de un gen, ya que esta región puede tener un papel en la regulación de la transcripción y/o traducción. Un promotor «constitutivo» es un promotor que está activo en la mayoría de los tejidos en la mayoría de las condiciones fisiológicas y de desarrollo. Un promotor «inducible» es un promotor que se regula fisiológicamente (por ejemplo, mediante aplicación externa de ciertos compuestos) o a través del desarrollo. Un promotor «específico de tejido» solo está activo en tipos específicos de tejidos o células. Un «promotor activo en plantas o células vegetales» se refiere a la capacidad general del promotor para impulsar la transcripción dentro de una planta o célula vegetal. No tiene ninguna implicación sobre la actividad espacio-temporal del promotor.

**[0026]** Los términos «proteína» o «polipéptido» se usan indistintamente y se refieren a moléculas constituidas por una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo específico de acción, tamaño, estructura tridimensional u origen. Por lo tanto, un «fragmento» o «porción» de una proteína puede ser referido también como una «proteína». Una «proteína aislada» se usa para referirse a una proteína que ya no está en su ambiente natural, por ejemplo, *in vitro* o en una célula huésped vegetal o bacteriana recombinante.

**[0027]** Una «planta modificada genéticamente» se refiere en este documento a una planta o célula vegetal que ha sido transformada, por ejemplo, mediante la introducción de un gen exógeno o una copia o copias adicionales de un gen endógeno, dicho gen exógeno o gen endógeno adicional puede integrarse en el genoma. Se entiende que una célula vegetal transgénica transformada con una secuencia de polinucleótidos (aislada) y células vegetales y plantas regeneradas a partir de la misma comprende dicha secuencia de polinucleótidos (aislada). Una célula vegetal transgénica puede referirse a una célula vegetal aislada o en cultivo tisular, o a una célula vegetal contenida en una planta o en un órgano o tejido diferenciado, y ambas posibilidades se incluyen específicamente en este documento. Por consiguiente, una referencia a una célula vegetal en la descripción o las reivindicaciones no pretende referirse solo a células aisladas o protoplastos en cultivo, sino que se refiere a cualquier célula vegetal, dondequiera que se encuentre o en cualquier tipo de tejido u órgano vegetal en que pueda estar presente. Los procedimientos para obtener células vegetales y plantas transgénicas son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a estos, la transformación mediada por *Agrobacterium* de explantes de plantas, bombardeo de partículas de explantes de plantas, transformación de explantes de plantas usando técnicas con triquitos, transformación usando vectores víricos, electroporación de protoplastos de plantas, captación directa de ADN por protoplastos utilizando polietilenglicol, microinyección de explantes de plantas y/o protoplastos. La transformación mediada por *Agrobacterium* es un procedimiento preferido para introducir la molécula de ácido nucleico de la

invención en explantes de plantas. *Agrobacterium tumefaciens* alberga un vector natural llamado plásmido Ti que fue diseñado para que sea adecuado para la introducción de moléculas de ácido nucleico exógeno en genomas vegetales. Para la transformación genética, los explantes derivados de plantas se incuban con suspensión de células de *Agrobacterium*, seguido del cultivo de los explantes en el medio que contiene un agente selectivo que promueve el crecimiento y la regeneración solo de las células transformadas.

**[0028]** Como se usa en el este documento, la «proteína aislada de resistencia a la sequía en plantas (polipéptido)», el «polipéptido aislado que mejora la capacidad resistente a la sequía de la planta», la «proteína BccJAZ5a aislada» o el «polipéptido BccJAZ5a aislado» se refiere a la proteína BccJAZ5a sustancialmente libre del 10 otras proteínas, lípidos, sacáridos y otras sustancias que pueden estar asociadas naturalmente con dicha proteína. Un experto en la materia puede usar técnicas estándares de purificación de proteínas para purificar la proteína BccJAZ5a. El polipéptido sustancialmente puro forma una única banda principal en un gel de poliacrilamida no reducido.

## 15 Descripción detallada de la invención

**[0029]** Los presentes inventores han aislado por primera vez un nuevo gen de resistencia a la sequía en plantas de *Brassica* spp., que puede usarse para proporcionar resistencia mejorada a la sequía o resistencia a la sequía en una planta. El gen aislado se denomina «BccJAZ5a», basado en el cual pueden producirse plantas 20 transgénicas con una capacidad mejorada de resistencia a la sequía.

**[0030]** La presente descripción se refiere a la mejora de la resistencia a la sequía de una planta modificando la expresión de un gen en dicha planta. La mejora es relativa a una planta en la que dicha modificación no se ha introducido o no está presente. Dicha planta es preferentemente de la misma especie y/o variedad. En otras 25 palabras, una planta modificada tal como se enseña en este documento, en comparación con la planta no modificada, es más capaz de crecer y sobrevivir en condiciones de menor disponibilidad de agua, privación de agua o condiciones de sequía.

**[0031]** El estrés por sequía, es decir, un periodo de disponibilidad limitada de agua adecuada como se describió más arriba, también puede manifestarse en un estado marchitado de la planta, es decir, en un estado en el 30 que una planta o parte de la misma tiene una turgencia reducida en comparación con un estado en el que el agua está disponible en cantidades suficientes para la planta. A este respecto, una planta modificada con una expresión aumentada (por ejemplo, con aumento, desrepresión o inserción de un gen) y/o actividad aumentada de la proteína JAZ5a puede estar menos marchita que una planta no modificada correspondiente si se expone al estrés por sequía 35 durante el mismo periodo en las mismas condiciones.

**[0032]** La disponibilidad limitada de agua o sequía debe entenderse como una situación en la que el agua es o puede convertirse en un factor limitante para la acumulación de biomasa o el rendimiento del cultivo para una 40 planta no transformada o natural en tal condición. Para una planta obtenida de acuerdo con un procedimiento de acuerdo con la presente invención y cultivada en dicha condición, el agua no puede ser, o lo es en menor grado, un factor limitante.

**[0033]** Los inventores actuales creen que al aumentar la expresión (por ejemplo, mediante el aumento, la desrepresión o la inserción de un gen) de JAZ5a se conduce a la presencia (o presencia incrementada) de la 45 proteína JAZ5a funcional, ya sea como consecuencia de una expresión alta o como consecuencia de una actividad/funcionalidad incrementada de la proteína JAZ5a, o ambas, y que dicha presencia (o presencia incrementada) de la proteína JAZ5a funcional conduce a una necesidad menor de agua y/o a una resistencia mejorada a la sequía de dicha planta.

50 **[0034]** En una realización, se describe el uso de una proteína para proporcionar una planta con resistencia a la sequía, en la que la proteína es:

- (a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de ID DE SECUENCIA N.º: 4; o
- (b) una proteína derivada de la proteína de (a) por sustitución, delección o adición de uno o más residuos en la 55 secuencia de aminoácidos de ID DE SECUENCIA N.º: 4 y en la que la proteína es funcionalmente equivalente a la secuencia de aminoácidos representada por la ID DE SECUENCIA N.º: 4; o
- (c) una proteína que tiene al menos una identidad de secuencia del 60 % con la secuencia de aminoácidos de ID DE SECUENCIA N.º: 4 y que tiene la misma función que la secuencia de aminoácidos representada por la ID DE SECUENCIA N.º: 4.

- 5 **[0035]** En una realización, dicha proteína de resistencia a la sequía en plantas tiene al menos una identidad de secuencia del 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con la secuencia de aminoácidos representada por la ID DE SECUENCIA N.º: 4.
- 5 **[0036]** En una realización, la proteína de resistencia a la sequía en plantas tiene 1-20, preferentemente 1-10, más preferentemente 1-5, lo más preferiblemente 1-3 residuos sustituidos, eliminados o añadidos en la secuencia de aminoácidos de ID DE SECUENCIA N.º: 4.
- 10 **[0037]** En una realización, la planta es una planta *Cruciferae*. En una realización, la planta de *Cruciferae* se selecciona del grupo constituido por la planta *Brassica* spp. y la planta *Abrabidopsis* spp. En una realización, la planta *Brassica* spp. es *Brassica campestris* ssp. *pekinensis*.
- 15 **[0038]** En una realización, la planta *Abrabidopsis* spp. es *Arabidopsis thaliana* (L.) *Heynh.* En una realización, la proteína de resistencia a la sequía en plantas se deriva de la planta *Brassica* spp., preferentemente derivada de *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*.
- 20 **[0039]** En una realización, el uso de un polinucleótido se describe para proporcionar una planta con resistencia a la sequía, que se selecciona del grupo que constituido por:
- (i) un polinucleótido que codifica dicha proteína; o  
(ii) un polinucleótido complementario al polinucleótido de (i).
- 25 En una realización, la secuencia de nucleótidos de dicho polinucleótido se especifica en la ID DE SECUENCIA N.º: 1 o 2. En una realización, se describe un gen quimérico que comprende dicho polinucleótido. En una realización, se describe un vector que contiene dicho polinucleótido. Dicho vector se puede elegir basándose en la célula huésped o la planta huésped utilizada. Un experto en la materia es capaz de seleccionar un vector adecuado para una célula huésped especificada.
- 30 **[0040]** Resulta claro para el experto en la materia que los genes, incluidos los polinucleótidos de la invención, pueden clonarse sobre la base de la información de secuencia de nucleótidos disponible, tal como se encuentra en la lista de secuencias adjunta, por procedimientos conocidos en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, el diseño de cebadores de ADN que representan las secuencias flanqueantes de dicho gen, de los cuales uno se genera en orientaciones sentido, y que inicia la síntesis de la cadena sentido, y el otro se crea de manera complementaria  
35 inversa y genera la cadena antisentido. Las polimerasas de ADN termoestables tales como las utilizadas en la reacción en cadena de la polimerasa se usan comúnmente para llevar a cabo tales experimentos. Alternativamente, las secuencias de ADN que representan genes pueden sintetizarse químicamente y posteriormente introducirse en moléculas vectores de ADN que pueden multiplicarse, por ejemplo, bacterias compatibles tales como *E. coli*.
- 40 **[0041]** En una realización, se describe una célula huésped diseñada genéticamente que comprende dicho vector o que comprende dicho polinucleótido integrado en el genoma. En una realización, se describe una planta que comprende cualquiera de los polinucleótidos anteriormente mencionados.
- 45 **[0042]** En una realización, se describe un procedimiento para preparar la proteína antes mencionada, que comprende:
- (a) cultivar dicha célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión;  
(b) aislar dicha proteína del cultivo.
- 50 **[0043]** En una realización, se describe el uso de la proteína mencionada anteriormente o un polinucleótido que codifica dicha proteína para proporcionar una planta con resistencia (mejorada) a la sequía. En una realización, el uso es para proporcionar una planta con resistencia (mejorada) a la sequía en la etapa de espigado.
- [0044]** En una realización, se describe un procedimiento para proporcionar una planta con resistencia  
55 mejorada a la sequía que comprende aumentar la expresión o actividad de la proteína mencionada anteriormente en dicha planta. En una realización, dicho procedimiento comprende transformar un polinucleótido que codifica la proteína mencionada anteriormente en el genoma de la planta. En una realización, dicho procedimiento comprende:
- (1) proporcionar a un *Agrobacterium* un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la



proteína de la invención;

(2) proporcionar una célula, órgano o tejido vegetal;

(3) poner en contacto la célula, el órgano o el tejido vegetal del paso (2) con el *Agrobacterium* del paso (1), de tal manera que el polinucleótido que codifica la proteína de la invención se introduzca en la célula vegetal

5 (3) opcionalmente, seleccionar la célula, órgano o tejido vegetal en el que se introdujo el polinucleótido que codifica la proteína de la invención;

(4) regenerar una planta a partir de la célula, órgano o tejido vegetal del paso (3).

10 En una realización, el polinucleótido que codifica la proteína de la invención se integra en el cromosoma de la célula vegetal.

**[0045]** En una realización, se describe una planta modificada genéticamente que comprende un polinucleótido que codifica la proteína de resistencia a la sequía en plantas de la invención.

15 **[0046]** En una realización de la presente invención, se describe un marcador molecular para identificar la resistencia a la sequía en una planta, en el que dicho marcador molecular comprende al menos 30, 35, 40, 45, 50, o más nucleótidos (contiguos) de la secuencia de ID DE SECUENCIA N.º 1 o 2. En una realización, se proporciona un procedimiento para identificar tal marcador molecular, comprendiendo dicho procedimiento el paso de secuenciar el ADN de una célula vegetal. En una realización, se proporciona un procedimiento para identificar tal marcador molecular que comprende el paso de amplificar dicha secuencia de ID DE SECUENCIA N.º: 1 o 2 y detectar el amplicón. En una realización, se proporciona un par de cebadores capaces de amplificar dicha secuencia de ID DE SECUENCIA N.º 1 o 2, en una realización adicional, el par de cebadores proporcionados está representado por las secuencias de nucleótidos de ID DE SECUENCIA N.º: 5 y 6.

25 **[0047]** No hay limitación específica sobre las plantas que se pueden usar en la presente invención, siempre y cuando la planta pueda transformarse, por ejemplo, usando un gen, gen quimérico o vector. Las plantas incluyen diversos cultivos, plantas de flores o plantas de silvicultura, etc. Específicamente, las plantas incluyen, pero sin estar limitadas a estas, dicotiledónea, monocotiledónea o gimnosperma. Más específicamente, las plantas incluyen, pero sin estar limitadas a estos, trigo, cebada, centeno, arroz, maíz, sorgo, remolacha, manzana, pera, ciruela, melocotón, albaricoque, cereza, fresa, *Rubus swinhoei* Hance, zarzamora, judía, lenteja, guisante, soja, colza, mostaza, amapola, olea europea, *Helianthus*, coco, planta que produce aceite de ricino, cacao, cacahuete, calabaza, pepino, sandía, algodón, lino, cannabis, yute, cítricos, limón, toronja, espinaca, lechuga, espárrago, col, *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*, *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*, zanahoria, cebolla, agave, tomate, pimiento verde, aguacate, cassia, alcanforero, tabaco, nuez, café, berenjena, caña de azúcar, té, pimienta, vid, hierba de ortiga, 30 plátano, árbol de caucho natural, plantas ornamentales, etc.

**[0048]** El término «planta(s)» incluye, pero sin limitarse a estas, plantas de *Cruciferae*, *Gramineae* y *Rosaceae*. Por ejemplo, la «planta» incluye, pero sin limitarse a estas, *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* y *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* de *Brassica* spp. de las *Cruciferae*; *Abrabidopsisspp.* de las *Cruciferae*; arroz de *Gramineae* y el tabaco, el melón y las frutas, los vegetales, la colza y similares. Más preferiblemente, la «planta» es una planta de *Brassica spp.* o *Abrabidopsis spp.* de las *Cruciferae*. 40

**[0049]** El polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido recombinante, un polipéptido natural o un polipéptido sintético. Preferiblemente, es un polipéptido recombinante. El polipéptido de la presente invención puede ser un producto purificado a partir de una fuente natural, sintetizado químicamente o producido de forma recombinante por huéspedes procariotas o eucariotas (tales como células de bacterias, levaduras, plantas superiores, insectos y mamíferos). En función del huésped utilizado en la producción recombinante, el polipéptido de la presente invención puede estar glicosilado o no glicosilado. El polipéptido de la presente invención puede incluir o no incluir el primer residuo de metionina nativo. 45

50 **[0050]** La presente descripción incluye además fragmentos, derivados y análogos de la proteína BccJAZ5a. Como se usa en este documento, los términos «fragmento», «derivado» y «análogo» se refieren al polipéptido que tiene sustancialmente la misma función biológica y/o actividad de la proteína BccJAZ5a de la presente invención. El fragmento, derivado o análogo del polipéptido tal como se enseña en este documento puede ser (i) un polipéptido en el que uno o varios residuos de aminoácidos conservadores (preferidos) o no conservadores están sustituidos por uno o más residuos de aminoácidos que están codificados genéticamente o no, o (ii) un polipéptido con uno o más residuos de aminoácidos que llevan un sustituyente, o (iii) un polipéptido de fusión del polipéptido maduro y otro compuesto (tal como un compuesto para extender la semivida del polipéptido, tal como polietilenglicol), o (iv) un polipéptido formado por una secuencia de aminoácidos adicional (tal como una secuencia líder o una secuencia de 55

secreción, o una secuencia que facilita la purificación, o una secuencia proteínogena, o una proteína de fusión) que se fusiona con la secuencia de polipéptidos. De acuerdo con las definiciones proporcionadas en este documento, estos fragmentos, derivados y análogos pueden ser entendidos por el experto en la materia.

5 **[0051]** Como se usa en este documento, el término «proteína BccJAZ5a» se refiere a un polipéptido que proporciona resistencia mejorada a la sequía o resistencia a la sequía a las plantas basándose en la secuencia de ID DE SECUENCIA N.º: 4. Este término también incluye variantes de ID DE SECUENCIA N.º: 4 que proporcionan una capacidad (mejorada) de resistencia a la sequía en plantas. Las mutaciones incluyen pero no se limitan a  
 10 deleción, inserción y/o sustitución de uno o más aminoácidos (generalmente 1-50, preferentemente 1-30, más preferentemente 1-20, lo más preferentemente 1-10, aún más preferentemente 1-8 o 1-5) y la adición o deleción de uno o más aminoácidos (generalmente no más de 20, preferentemente no más de 10, más preferentemente no más de 5) en el extremo C-terminal y/o el extremo N-terminal. Por ejemplo, se entiende que la sustitución con un residuo de aminoácido que tiene propiedades cercanas o similares generalmente no afectará a la función de la proteína. Además, por ejemplo, la adición o deleción de uno o más aminoácidos del extremo C-terminal y/o del extremo N-  
 15 terminal no afectará generalmente a la función de la proteína. El término incluye también los fragmentos activos y derivados activos de la proteína BccJAZ5a.

**[0052]** Las variantes del polipéptido incluyen sus secuencias homólogas, mutantes conservadores, mutante alélico, mutante natural, mutante inducido, proteína codificada por un ADN que podría hibridarse con el ADN de la  
 20 proteína BccJAZ5a en una condición muy estricta o poco estricta y el polipéptido o proteína obtenida utilizando un antisuero contra la proteína BccJAZ5a. La presente descripción también proporciona polipéptidos más relacionados, tales como proteínas de fusión que contienen la proteína BccJAZ5a o fragmentos de la misma. Además de los polipéptidos de longitud completa o de longitud casi completa, la presente descripción también incluye los fragmentos solubles de la proteína BccJAZ5a. Generalmente, el fragmento contiene al menos aproximadamente 20,  
 25 generalmente al menos aproximadamente 30, preferentemente al menos aproximadamente 50, más preferentemente al menos aproximadamente 80, lo más preferentemente al menos aproximadamente 100 aminoácidos continuos de la proteína BccJAZ5a.

**[0053]** La presente invención también describe análogos de la proteína o polipéptido BccJAZ5a. Estos  
 30 análogos pueden ser diferentes de la proteína BccJAZ5a nativa en la secuencia primaria o en patrones de modificación a lo largo de la misma secuencia primaria, o ambos. Estos polipéptidos incluyen los mutantes genéticos naturales o inducidos. Los mutantes inducidos pueden obtenerse a través de diversas técnicas, por ejemplo, por radiación o por exposición a un mutágeno para producir una mutagénesis aleatoria. También pueden obtenerse por mutagénesis de sitio dirigido o por otras tecnologías biológicas conocidas. Los análogos incluyen también aquellos  
 35 que tienen residuos diferentes del L-aminoácido natural (tal como D-aminoácido) y aquellos que tienen aminoácidos no naturales o sintéticos, tales como  $\beta$ -aminoácidos y  $\gamma$ -aminoácidos. Debe entenderse que el polipéptido como se enseña en este documento no está limitado a los ejemplos representativos anteriores.

**[0054]** Los patrones de modificación, que no cambiarán la estructura primaria, incluyen derivación química *in vivo* o *in vitro*, tales como acetilación o carboxilación. La modificación también puede ser glicosilación. La modificación también puede ser fosforilación de los residuos de aminoácidos (tales como, tirosina fosforilada, serina fosforilada y treonina fosforilada) en la secuencia. También se incluyen polipéptidos que se modifican para tener una propiedad antiproteólisis mejorada o para optimizar la propiedad de solubilidad.

45 **[0055]** En la presente descripción, «un mutante conservador de la proteína BccJAZ5a» se refiere a un polipéptido que tiene hasta 20, preferentemente hasta 10, más preferentemente hasta 5, lo más preferentemente hasta 3 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de ID DE SECUENCIA N.º: 4 que están sustituidos por los aminoácidos con propiedades similares o cercanas. Estos polipéptidos mutantes se producen preferentemente de acuerdo con el reemplazo de aminoácido que se muestra a continuación en la tabla 1.

50

Tabla 1

| Residuo de aminoácido | Sustitución representativa | Sustitución preferida |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------|
| Ala (A)               | Val; Leu; Ile              | Val                   |
| Arg (R)               | Lys; Gln; Asn              | Lys                   |
| Asn (N)               | Gln; His; Lys; Arg         | Gln                   |
| Asp (D)               | Glu                        | Glu                   |
| Cys (C)               | Ser                        | Ser                   |

|         |                         |     |
|---------|-------------------------|-----|
| Gln (Q) | Asn                     | Asn |
| Glu (E) | Asp                     | Asp |
| Gly (G) | Pro; Ala                | Ala |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg      | Arg |
| Ile (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe | Leu |
| Leu (L) | Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile |
| Lys (K) | Arg; Gln; Asn           | Arg |
| Met (M) | Leu; Phe; Ile           | Leu |
| Phe (F) | Leu; Val; Ile; Ala; Tyr | Leu |
| Pro (P) | Ala                     | Ala |
| Ser (S) | Thr                     | Thr |
| Thr (T) | Ser                     | Ser |
| Trp (W) | Tyr; Phe                | Tyr |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser      | Phe |
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala | Leu |

**[0056]** La presente descripción proporciona además las secuencias de polinucleótidos que codifican la proteína BccJAZ5a de la presente invención o los polipéptidos variantes de las mismas.

5 **[0057]** Los polinucleótidos, tal como se enseñan en este documento, pueden ser moléculas de ADN o ARN. Las moléculas de ADN incluyen ADNc, ADN genómico y ADN sintético. Las moléculas de ADN pueden estar en forma de una sola cadena o de cadena doble. La molécula de ADN puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante. La secuencia codificante que codifica el polipéptido maduro puede ser idéntica a la secuencia codificante de ID DE SECUENCIA N.º: 1 o 2, o pueden ser sus variantes de degeneración. Tal como se utiliza en este  
10 documento, una «variante de degeneración» se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la secuencia de ID DE SECUENCIA N.º: 4 con una secuencia de nucleótidos diferente de la secuencia codificante como se establece en la ID DE SECUENCIA N.º: 1 o 2.

15 **[0058]** Los polinucleótidos que codifican el polipéptido de ID DE SECUENCIA N.º: 4 pueden comprender una secuencia codificante que codifica solo el polipéptido maduro; una secuencia codificante del polipéptido maduro y una secuencia codificante adicional; la secuencia codificante del polipéptido maduro y una secuencia no codificante, opcionalmente, así como una secuencia codificante adicional.

20 **[0059]** El término «polinucleótido que codifica un polipéptido» puede incluir opcionalmente, además del polinucleótido que codifica dicho polipéptido, un polinucleótido adicional codificante y/o no codificante.

25 **[0060]** La presente descripción se refiere además a variantes de los polinucleótidos anteriores, que codifican la misma secuencia de aminoácidos del polipéptido de la presente invención, y fragmentos, análogos y derivados de los mismos. Las variantes de los polinucleótidos pueden ser mutantes alélicos naturales o mutantes no naturales. Las variantes de nucleótidos incluyen variantes de sustitución, variantes de delección y variantes de inserción. Como se conoce en la técnica anterior, una variante alélica es una forma alternativa de un polinucleótido, en el que la mutación puede ser sustitución, delección o inserción de uno o más nucleótidos, pero la función del polipéptido codificado por la variante alélica está sustancialmente inalterada.

30 **[0061]** La presente descripción también se refiere a un polinucleótido que se hibrida con cualquiera de las secuencias anteriores y que tiene al menos una identidad de secuencia del 50 %, preferentemente al menos del 70 %, más preferentemente al menos del 80 % entre las dos secuencias. La presente invención se refiere específicamente a un polinucleótido que se hibrida con los polinucleótidos de la presente invención en condiciones estrictas. En la presente invención, la «condición estricta» se refiere a: (1) hibridación y elución a una fuerza iónica  
35 relativamente baja y a una temperatura relativamente más alta, tal como SSC 0,2x, SDS 0,1 %, 60 °C; o (2) presencia de un agente de desnaturalización durante la hibridación, tal como formamida al 50 % (v/v), suero de ternera al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %, 42 °C, y similares; o (3) condiciones que solo permiten la hibridación entre dos secuencias que tienen al menos una identidad del 80 %, preferentemente al menos del 90 %, más preferentemente al menos del 95 %. Además, el polipéptido codificado por el polinucleótido hibridante presenta la misma función y  
40 actividad biológica que las del polipéptido maduro como se muestra en la ID DE SECUENCIA N.º: 4.

**[0062]** La presente descripción también se refiere a fragmentos de ácido nucleico que pueden hibridar con cualquiera de las secuencias anteriores. Como se usa en este documento, un «fragmento de ácido nucleico»

contiene al menos 15 nucleótidos, preferentemente al menos 30 nucleótidos, más preferentemente al menos 50 nucleótidos, lo más preferentemente al menos 100 nucleótidos. El fragmento de ácido nucleico puede usarse en la técnica de amplificación de ácido nucleico (tal como PCR) para determinar y/o aislar el polinucleótido que codifica la proteína BccJAZ5a.

5

**[0063]** La secuencia de nucleótidos de longitud completa de la proteína BccJAZ5a, como se enseña en este documento, o el fragmento de la misma puede prepararse típicamente mediante un procedimiento de amplificación por PCR, procedimiento recombinante o síntesis artificial. En cuanto a la amplificación por PCR, las secuencias de interés pueden amplificarse diseñando cebadores de acuerdo con la secuencia de nucleótidos relacionada descrita en la presente invención, por ejemplo, el marco de lectura abierto, y utilizando una biblioteca de ADNc comercialmente disponible o una biblioteca de ADNc preparada de acuerdo con cualquiera de los procedimientos convencionales conocidos en la técnica como una plantilla. Para una secuencia grande, pueden ser necesarias dos o más amplificaciones de PCR, los fragmentos obtenidos en cada amplificación pueden fusionarse juntos, por ejemplo, mediante ligadura, en una orientación correcta.

15

**[0064]** Una vez que se obtiene la secuencia, se puede producir en una gran cantidad usando técnicas recombinantes. La secuencia puede clonarse en un vector. El vector puede transformarse en una célula y, a continuación, la secuencia puede aislarse a partir de células huésped proliferadas usando medios convencionales.

20 **[0065]** Además, la secuencia relacionada puede sintetizarse mediante síntesis artificial, especialmente cuando el fragmento es relativamente corto. Generalmente, varios fragmentos pequeños se sintetizan primero y después se fusionan, por ejemplo, mediante ligadura o PCR de fusión, en un fragmento grande. La secuencia de ADN que codifica la proteína (o fragmento, o variante, o derivado del mismo) de la presente invención puede prepararse mediante síntesis química. La secuencia de ADN obtenida puede incorporarse a diversas moléculas de ADN conocido (tales como vectores) y luego a células. Además, pueden introducirse mutaciones en la secuencia de proteínas (es decir, la secuencia que codifica la secuencia de proteínas) de la presente invención a través de la síntesis química.

25

**[0066]** La presente descripción también se refiere a un vector que comprende el polinucleótido de la presente invención, una célula huésped modificada genéticamente para comprender el vector o la secuencia codificante de la proteína BccJAZ5a de la presente invención, y un procedimiento para producir de forma recombinante el polipéptido de la presente invención.

30

**[0067]** El polinucleótido como se enseña en el presente documento puede usarse para expresar o producir una proteína BccJAZ5a recombinante usando técnicas convencionales de ADN recombinante. Los siguientes pasos pueden incluirse en tal uso:

35

(1) transformar o transfectar una célula huésped con un polinucleótido (o su variante) que codifica la proteína BccJAZ5a de la presente invención, o un vector de expresión recombinante que comprende dicho polinucleótido;

40

(2) cultivar la célula huésped en un medio de cultivo;

(3) aislar y purificar la proteína del medio de cultivo o de las células cultivadas.

**[0068]** En la presente descripción, la secuencia de polinucleótidos de la proteína BccJAZ5a puede insertarse en un vector de expresión recombinante. El término «vector de expresión recombinante» se refiere a un plásmido bacteriano, fago, plásmido de levadura, virus de células vegetales, virus de células de mamífero y cualquier otro vector conocido en la técnica. En resumen, se pueden usar cualquier plásmido y vectores mientras puedan replicarse y retenerse establemente en el huésped. Los vectores de expresión pueden contener un origen de replicación, un promotor, marcadores y un elemento de control de la traducción.

45

50 **[0069]** Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para construir un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN que codifica la proteína BccJAZ5a y las señales reguladoras de la transcripción/traducción. Estos procedimientos incluyen técnicas recombinantes *in vitro*, síntesis de ADN, técnicas recombinantes *in vivo*, etc. La secuencia de ADN puede estar unida operativamente bajo un promotor para dirigir la síntesis de ARNm en el vector de expresión. El vector de expresión puede incluir además un sitio de unión al ribosoma para iniciar la traducción y un terminador de la transcripción.

55

**[0070]** Además, el vector de expresión puede contener uno o más genes marcados selectivamente para proporcionar rasgos fenotípicos para seleccionar las células huésped transformadas. Los genes marcados pueden codificar, por ejemplo, dihidrofolato reductasa, resistencia a la neomicina y proteína fluorescente verde (GFP) para el

cultivo de células eucariotas, y resistencia a la kanamicina o ampicilina para *E. coli*.

**[0071]** El vector que comprende la secuencia de ADN anterior y el promotor adecuado o la secuencia reguladora puede usarse para transformar las células huésped para la expresión de proteínas.

5

**[0072]** La célula huésped puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana; o célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura; o una célula eucariota superior, tal como una célula vegetal. Ejemplos de estas incluyen *E. coli*, *Streptomyces*, *Agrobacterium*, células de hongos tales como levadura, células de plantas, etc.

10 **[0073]** Cuando se expresa el polinucleótido como se enseña en este documento en una célula eucariota superior, la transcripción puede aumentarse cuando se inserta una secuencia potenciadora en el vector. El potenciador puede ser un factor del ADN que actúa en cis, que puede contener de aproximadamente de 10 a 300 pb y actúa sobre un promotor para aumentar la transcripción del gen.

15 **[0074]** El experto en la materia sabe cómo seleccionar un vector, un promotor, un potenciador y una célula huésped.

**[0075]** La transformación de una célula huésped con el ADN recombinante puede llevarse a cabo usando técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia. Cuando los huéspedes son células procariotas, tales como *E. coli*, las células competentes que pueden captar el ADN pueden recolectarse después de la fase de crecimiento exponencial y luego tratarse por el método de CaCl<sub>2</sub>, según los procedimientos conocidos en la técnica. Otro procedimiento es usar MgCl<sub>2</sub>. Si se desea, la transformación podría llevarse a cabo usando electroporación. Cuando la célula huésped es de origen eucariota, pueden usarse uno o más de los procedimientos de transfección de ADN siguientes: precipitación con fosfato cálcico, procedimiento mecánico convencional tal como microinyección, electroporación, lipofección, etc. También puede lograrse la transformación de la planta mediante la transformación de un *Agrobacterium* o transformación mediante biobalística, y similares, tales como la transformación de discos de hojas, la transformación de embriones inmaduros de arroz, etc. Puede regenerarse una planta a partir de la célula, tejido u órgano vegetal transformado mediante procedimientos convencionales, a fin de obtener una planta que tenga rasgos alterados.

30

**[0076]** El transformante puede cultivarse de maneras convencionales para expresar el polipéptido codificado por el gen tal como se enseña en este documento. Dependiendo de la célula huésped usada, el medio de cultivo usado en el cultivo puede seleccionarse de entre diversos medios de cultivo (convencionales). El cultivo puede llevarse a cabo en condiciones adecuadas para el crecimiento de la célula huésped. Cuando la célula huésped crece hasta una densidad adecuada, el promotor seleccionado puede inducirse mediante un procedimiento adecuado (por ejemplo, un cambio de temperatura o inducción química), después de lo cual la célula puede cultivarse adicionalmente durante un periodo de tiempo.

35

**[0077]** En los procedimientos anteriores, el polipéptido recombinante puede expresarse en la célula o en la membrana celular, o puede ser secretado fuera de la célula. Si se desea, la proteína recombinante podría aislarse y purificarse mediante diversos procedimientos de aislamiento utilizando las propiedades físicas, químicas u otras propiedades de la proteína. Estos procedimientos son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de estos incluyen, pero sin estar limitados a estos, el tratamiento de renaturalización convencional, el tratamiento con precipitante de proteínas (tal como la precipitación salina), la centrifugación, la ósmosis (para interrumpir la bacteria), el ultratratamiento, la ultracentrifugación, la cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), la cromatografía de adsorción, la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía líquida, tal como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la otra, y combinaciones de los mismos.

45

**[0078]** El BccJAZ5a recombinante puede usarse en muchas aplicaciones. Por ejemplo, puede usarse para cribar el anticuerpo, el polipéptido o los otros ligandos agonistas o antagonistas a la función de la proteína BccJAZ5a. La criba de una biblioteca de polipéptidos con la proteína BccJAZ5a recombinante expresada puede ayudar a encontrar moléculas de polipéptidos valiosas que podrían inhibir o estimular la función de la proteína BccJAZ5a.

50

55 **[0079]** El polinucleótido completo tal como se enseña en este documento o una porción del mismo puede usarse como una sonda, que puede fijarse en una micromatriz multigénica o un chip de ADN (también denominado «chip genético») para realizar un análisis de la expresión diferencial de genes. Los cebadores específicos para la proteína BccJAZ5a para realizar la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) de ARN para la amplificación *in vitro* también pueden usarse para detectar los productos de transcripción de la proteína

BccJAZ5a.

**[0080]** La presente descripción también se refiere a un procedimiento para modificar una planta (para proporcionar a la planta resistencia mejorada a la sequía o resistencia a la sequía), que comprende aumentar o proporcionar la expresión del gen *BccJAZ5a* o la actividad de la proteína codificada en la planta.

**[0081]** Los procedimientos para aumentar o proporcionar la expresión del gen *BccJAZ5a* son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las plantas pueden transformarse con una construcción de expresión que lleva el gen codificador de *BccJAZ5a* para expresar el gen *BccJAZ5a*. Puede usarse un promotor para aumentar la expresión del gen *BccJAZ5a*. Un potenciador (por ejemplo, el primer intrón del gen ceroso del arroz o el primer intrón del gen de la Actina, y similares) pueden usarse para aumentar la expresión del gen *BccJAZ5a*. Los promotores que pueden usarse en la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a estos, el promotor 35S y el promotor Ubi en arroz y maíz.

**[0082]** En una realización de la presente descripción, un procedimiento para obtener una planta con una expresión mejorada de la proteína BccJAZ5a incluye:

- (1) proporcionar una cepa de *Agrobacterium* que comprende un vector de expresión, en el que el vector de expresión contiene un polinucleótido que codifica una proteína BccJAZ5a;
- (2) poner en contacto una célula, tejido u órgano vegetal con el *Agrobacterium* del paso (1) de tal manera que el polinucleótido que codifica la proteína BccJAZ5a se transfiera a la célula vegetal y pueda integrarse en el genoma, transformando de este modo la célula vegetal;
- (3) opcionalmente, seleccionar la célula o tejido vegetal transformado con el polinucleótido que codifica la proteína BccJAZ5a; y
- (4) regenerar una planta a partir de la célula o tejido vegetal del paso (3).

**[0083]** En este proceso se puede utilizar cualquier medio convencional adecuado, incluyendo reactivos y controles de temperatura y presión.

**[0084]** La presente descripción también incluye agonistas de la proteína BccJAZ5a o un polinucleótido que codifica la proteína BccJAZ5a de la invención. Dado que los agonistas de la proteína BccJAZ5a pueden regular la actividad o expresión de la proteína BccJAZ5a, dichos agonistas también pueden proporcionar resistencia a la sequía o mejoras de la misma a una planta al afectar a la proteína BccJAZ5a, para lograr mejoras en los rasgos.

**[0085]** Los agonistas de la proteína BccJAZ5a pueden referirse a cualquier sustancia que pueda aumentar la actividad de BccJAZ5a, mantener la estabilidad de BccJAZ5a, promover la expresión de BccJAZ5a, prolongar la duración del efecto de BccJAZ5a o promover la transcripción y traducción de *BccJAZ5a*. Estas sustancias pueden usarse en la presente invención como agentes para aumentar la resistencia a la sequía de una planta.

**[0086]** En una realización de la presente descripción, se proporciona un gen *BccJAZ5a*, cuya secuencia genómica se enumera en la ID DE SECUENCIA N.º: 1, y cuya secuencia de ADNc está indicada en la ID DE SECUENCIA N.º: 2. Dicho gen codifica una proteína que contiene 270 aminoácidos (ID DE SECUENCIA N.º: 4). Dicho gen *BccJAZ5a* proporciona una nueva ruta para la modificación de la tolerancia a la sequía de la planta.

**[0087]** La presente invención se ilustrará adicionalmente en combinación con los ejemplos siguientes. Debe entenderse que estos ejemplos son para ilustrar la presente invención, pero no debe entenderse que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera. Los procedimientos experimentales, en los que no se indican las condiciones específicas en los siguientes ejemplos se realizan usando condiciones convencionales, tales como las descritas en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002), o de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. A menos que se indique específicamente otra cosa, el porcentaje y la parte se calculan en función del peso. A menos que se indique específicamente otra cosa, todos los términos científicos usados en este documento tienen los mismos significados que los familiares para el experto en la materia. Además, pueden usarse en la presente invención cualquier procedimiento y material equivalentes a los contenidos descritos. El procedimiento y el material de la práctica preferidos descritos en la presente memoria son solo de carácter ilustrativo.

**[0088]** Además, se entiende que las diversas modificaciones y/o cambios son evidentes para un experto en la materia, a la vista de la enseñanza anterior de la presente invención, que entra dentro del alcance según queda definido en la descripción y las reivindicaciones.

**Listado de secuencias**

**[0089]**

- 5 ID DE SECUENCIA N.º 1: secuencia de ADN genómico que codifica la proteína BccJAZ5a  
 ID DE SECUENCIA N.º 2: secuencia de ADNc que codifica la proteína BccJAZ5a  
 ID DE SECUENCIA N.º 3: secuencia de ADN genómico que codifica la proteína BccJAZ5b  
 ID DE SECUENCIA N.º 4: secuencia de aminoácidos de la proteína BccJAZ5a  
 10 ID DE SECUENCIA N.º 5: cebador directo 5' AAGAAGCCAAGTCTGTGA 3'  
 ID DE SECUENCIA N.º 6: cebador inverso 5' TCGGAGGATAATGATGAC 3'

**EJEMPLOS**

- 15 **[0090]** Las progenies de segregación T3 (recolectadas de 6 plantas individuales) a partir de dos eventos de transformación individuales de *Arabidopsis thaliana* (At) con la secuencia de nucleótidos que codifica BccJAZ5a de *Brassica rapa* ssp. *chinensis* detrás de un promotor constitutivo 35S (35S::BccJAZ5a) (en lo sucesivo denominadas semillas mutantes o plantas mutantes) se obtuvieron del National Laboratory of Plant Molecular Genetics, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, 300 Fenglin Road, Shanghai 200032, China. Como control de At, Col-0 (Columbia, N60000, en lo sucesivo denominada semilla o planta control) se obtuvieron del Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASc, NASc; School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, LE12 5RD Reino Unido).

- [0091]** Para el gen «BccJAZ5» de la presente invención se proporcionan dos secuencias genómicas, que son respectivamente *BccJAZ5a* (copia a) y *BccJAZ5b* (copia b). La secuencia genómica de *BccJAZ5a* se indica en la ID DE SECUENCIA N.º: 1, su secuencia CDS se indica en la ID DE SECUENCIA N.º: 2. Codifica una proteína «BccJAZ5a» que tiene 270 aa (ID DE SECUENCIA N.º: 4). La secuencia genómica de *BccJAZ5b* se muestra en la ID DE SECUENCIA N.º: 3.

- 30 **[0092]** La expresión de BccJAZa de *Brassica rapa* ssp. *chinensis* se confirmó con una RT-PCR semicuantitativa. Los cebadores usados fueron:

*BccJAZ5a*:

- 35 **[0093]**

Directo: 5 'AAGAAGCCAAGTCTGTGA 3' (ID DE SECUENCIA N.º: 5);  
 Inverso: 5 'TCGGAGGATAATGATGAC 3' (ID DE SECUENCIA N.º: 6).

- 40 Medio de crecimiento:

- [0094]** Se utilizó una mezcla de suelo que comprendía una parte de arena, una parte de vermiculita y dos partes de compost (arena:vermiculita:compost = 1:1:2). Esta mezcla aumenta la percolación del agua y, por lo tanto, facilita la captación uniforme del agua por parte de cada maceta y un mejor drenaje del agua. Antes de la siembra, las semillas se mantuvieron a 4 °C durante 3 días en condiciones oscuras y húmedas para la estratificación.

- [0095]** Se sembraron tanto semillas mutantes como de control en cestas de 60 ml (ARABASKETS, de Lehle seeds) con una densidad de 1 planta por maceta. Para cada genotipo, hubo 20 réplicas. Las cestas se mantuvieron en una bandeja rectangular que contenía 8 x 5 = 40 orificios de ~4 cm de diámetro. Las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento con 16 horas de día (24 °C) y 8 horas de noche (20 °C) a una humedad relativa del 60-70 %. Los primeros 3 días después de la siembra las plantas se mantuvieron a una humedad del 100 % cubriéndolas con tapas transparentes o bolsas de plástico transparentes. La solución nutritiva (EC = 1,5) se suministró a todas las plantas desde el fondo de las macetas en la bandeja 10 días después de la germinación (DDG), y a los 15 DDG las plantas fueron sometidas a sequía (durante 19, 20 o 21 días) transfiriendo las macetas a bandejas secas.  
 55 Posteriormente, las plantas se rehidrataron y se observó su recuperación después de 1 semana.

- [0096]** Se incluyeron réplicas de las progenies T3 mutantes recolectadas individualmente de dos eventos de transformación individuales y réplicas de plantas control. El tiempo total necesario para una prueba completa fue de aproximadamente 36-39 días.

*Examen del ensayo de sequía*

**[0097]** A los 10 DDG, las plantas recibieron nutrición (EC - 1,5) y a los 15 DDG cada maceta se movió a una bandeja seca. A partir de este día las plantas no recibieron agua. Mientras se suspendió el agua, las macetas se cambiaron aleatoriamente de orden diariamente dentro de las bandejas para reducir los efectos de posición y permitir una evaporación uniforme. Se observaron las plantas todos los días, especialmente se observó el control (o tipo salvaje) (Col-0) para detectar signos de marchitez (véase la figura 1). En el día de sequía (DDS) 19, Col-0 se marchitó completamente y no se recuperó tras la rehidratación. Determinamos este día como su punto de marchitez permanente (PMP). A partir de este día, las réplicas del mutante se rehidrataron y se observaron para detectar los signos de recuperación y se les hicieron fotografías (véase la figura 2). Las plantas mutantes mostraron supervivencia durante al menos 1 día más en sequía que el control.

Tabla 2: Supervivencia después de la rehidratación. Los lotes de plantas se rehidrataron a partir del DDS 19. Las réplicas representativas se eligieron para ser realmente rehidratadas. Las columnas DDR 1, 2, 3 (día de rehidratación) contienen los datos que indican la proporción de plantas que sobrevivieron y las plantas que murieron.

| Línea                          | DDR 1 (19 DDS) | DDR 2 (20 DDD) | DDR 3 (21 DDS) |
|--------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| 35S:BcPJAZ5a semillas T3 línea |                |                |                |
| 1, #12                         | 1:1            | 2:2            | 0:4            |
| 35S:BcPJAZ5a semillas T3 línea |                |                |                |
| 1, #13                         | 1:1            | 1:3            | 0:4            |
| Col-0                          | 0:2            | 0:4            | 0:4            |
| 35S:BcPJAZ5a semillas T3 línea |                |                |                |
| 3, #12                         | 2:0            | 2:2            | 0:4            |
| 35S:BcPJAZ5a semillas T3 línea |                |                |                |
| 3, #13                         | 2:0            | 1:3            | 0:4            |
| 35S:BcPJAZ5a semillas T3 línea |                |                |                |
| 3, #14                         | 2:0            | 3:1            | 1:3            |
| Col-0                          | 1:1            | 0:4            | 0:4            |

*Estudio de los dominios de la proteína JAZ5a, sus variantes y funciones*

**[0098]** Los inventores de la presente solicitud han identificado dominios en la proteína BccJAZ5a (ID DE SECUENCIA N.º: 4). Las posiciones 101-130 constituyen un dominio tify, y el segmento de 184-209 es un motivo CCT\_2. Estos dominios pueden ser sitios activos importantes para la función de resistencia a la sequía de la proteína.

**[0099]** Basándose en el análisis anterior, los inventores construyen varias variantes de la proteína BccJAZ5a como se especifica a continuación:

En la secuencia de la proteína BccJAZ5a (ID DE SECUENCIA N.º: 4), el aminoácido 9 se cambia de A a V, con el fin de obtener la variante BccJAZ5a-M1.

En la secuencia de la proteína BccJAZ5a (ID DE SECUENCIA N.º: 4), el aminoácido 253 se cambia de L a I, con el fin de obtener la variante BccJAZ5a-M2.

En la secuencia de la proteína BccJAZ5a (ID DE SECUENCIA N.º: 4), el aminoácido 147 se cambia de V a A, con el fin de obtener la variante BccJAZ5a-M3, y el aminoácido 230 se cambia de L a I.

En la secuencia de la proteína BccJAZ5a (ID DE SECUENCIA N.º: 4), se eliminan los aminoácidos 266-270, con el fin de obtener la variante BccJAZ5a-M4.

En la secuencia de la proteína BccJAZ5a (ID DE SECUENCIA N.º: 4), se eliminan los aminoácidos 159-161, con el fin de obtener la variante BccJAZ5a-M5.

En la secuencia de la proteína BccJAZ5a (ID DE SECUENCIA N.º: 4), se añaden cuatro aminoácidos ATAA al extremo C-terminal, con el fin de obtener la variante BccJAZ5a-M6.

**[0100]** La secuencia CDS del gen *BccJAZ5a* mostrado en la ID DE SECUENCIA N.º: 2 se clona en primer lugar en el vector pCAMBIA1300 en el sitio *Kpn* I para obtener un vector recombinante que contiene dicho CDS. A continuación, se lleva a cabo la mutagénesis de sitio dirigido para introducir la sustitución, delección y adición correspondientes para obtener los vectores recombinantes que contienen las variantes antes mencionadas



respectivamente.

**[0101]** Los vectores recombinantes así contruidos se transforman en cepas de *Agrobacterium*, y luego las cepas de *Agrobacterium* se utilizan para transformar *Arabidopsis*, de manera que se obtienen plantas de *Arabidopsis* transgénicas. Un tratamiento de sequía como el descrito anteriormente se utiliza para verificar el fenotipo de estas plantas *Arabidopsis* transgénicas. Las plantas transgénicas muestran una resistencia a la sequía mejorada en comparación con las plantas de tipo salvaje.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

**[0102]**

<110> Keygene  
Tunen, Arjen van

15

<120> A plant drought resistance gene JAZ5a

<130> P30821PC00

20 <150> US 61/505,391

<151> 07/07/2011

<160> 6

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1587

<212> ADN

30 <213> *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*

<400> 1

ES 2 627 330 T3

|            |            |             |            |             |            |      |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| ataaaacaca | tgagcgagct | cgacgcatcc  | cacttctctt | tcttccattt  | gacgcacaga | 60   |
| aaaaggaaaa | ataagataac | aaatacataa  | ctaaaaacaa | acagaattct  | ggagaatctc | 120  |
| tccttattat | tcacaatatg | tcaagaaatg  | aagatggtga | ggcaccaccg  | ccggagaagt | 180  |
| ccaacttcac | ccggcgatgt | agtttgctca  | gccgttactt | gaaggagaag  | ggtagtctcg | 240  |
| gtaatataga | tcttggattg | gtccgaaagc  | ctggtccgga | tctcggggtta | cccggaaact | 300  |
| ctgatcaaca | aggtacttta | tatcttctta  | gctctcacgt | ccgccacttg  | taatagtaaa | 360  |
| gtctggtttt | atcttattta | tttgcaagtc  | acttccttaa | aactcgaatt  | aatctacttt | 420  |
| tgtaatatgt | aaccaggaaa | atataagaag  | agaatttagt | tgattttgga  | aactgatacg | 480  |
| gttcatgaat | cgcaaaaaat | aattatcttt  | tgtagagttt | attcgtttga  | tgattccaat | 540  |
| aaagcttata | agagtttttt | attctcttta  | ttcagagaaa | caaaatgtga  | tgcataaggc | 600  |
| aaattcggaa | ctcaaagccc | ttaatgtctt  | aggcgaacco | tctagttcat  | ttggaggcaa | 660  |
| agccaaagct | accaatctca | ggtgagatct  | ataataatac | ttggtgctct  | tccggtttta | 720  |
| aatggttctc | ttctgaaacc | ggattttggt  | ttacagtgaa | ccatcagagc  | caattagttc | 780  |
| tcagctgaca | atattctttg | gaggaaaagt  | tctagtatac | aatgagtttc  | cttcagacaa | 840  |
| agctaaagag | ataatacagg | tagcaaaaaga | agccaagtct | gtgactgata  | ttaacattca | 900  |
| gacacaaatc | aatgtccaaa | aggaccacaa  | caaaagcaac | atagttcttc  | ctgatctcaa | 960  |
| cgagcccaca | gatactgctg | atgtcaatca  | acagcaacaa | caacaaaacc  | agctcgtgga | 1020 |
| acgtatagca | cgtagagctt | ccttacatcg  | cttctttgct | aaacgtaaag  | acaggtaaac | 1080 |
| atagcttgac | tagttcaaaa | gattatgtat  | ttgaaaacta | taagtgctct  | taaatgatcc | 1140 |
| tagtaatcaa | tcaaaaccgc | gatagatact  | cacatgacaa | tttctgtata  | ttttgttttt | 1200 |
| tcatcacagg | gctgtggcta | gagctccata  | ccaagttaac | caaaatggtg  | gtggtcatca | 1260 |
| ttatcctcog | aagccagaga | ctgtacctgg  | tcaacagcta | gagcagggac  | agtcgtcaca | 1320 |
| accacaacga | ccggctcaac | caaaccaga   | atgtgataaa | gatatggtga  | tggaagttaa | 1380 |
| ggaagaaggc | cagtgttcga | aagatctcga  | acttaggcta | taatcaatt   | ttgttaaata | 1440 |
| tttgaagaa  | acttaaactt | aagatgatcg  | tctgacttat | tttaaatgat  | ttttgctttg | 1500 |
| tactaaagtt | tgcaaccaat | ttttaacttg  | gatattaata | aatgcaatag  | tgaatttagt | 1560 |
| tgcaatttat | aacaatttga | tttgc       |            |             |            | 1587 |

<210> 2  
<211> 813

ES 2 627 330 T3

<212> ADN

<213> *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*

<400> 2

5

```

atgtcaagaa atgaagatgg tgaggcacca cgcgccgaga agtccaactt caccgcgga      60
tgtagtttgc tcagccgta cttgaaggag aagggtagtt tcggtaatat agatcttgga      120
ttggtccgaa agcctggtcc ggatctcggg ttaccggaa actctgatca acaagagaaa      180
caaaatgtga tgcataaggc aaattcggaa ctcaaagccg ttaatgtctt aggcgaacct      240
tctagttcat ttggaggcaa agccaaagct accaatctca gtgaaccatc agagccaatt      300
agttctcagc tgacaatatt ctttgaggga aaagttctag tatacaatga gtttccttca      360
gacaaagcta aagagataat acaggtagca aaagaagcca agtctgtgac tgatattaac      420
attcagacac aatcaatgt ccaaaaggac cacaacaaaa gcaacatagt tcttctgat      480
ctcaacgagc ccacagatac tgcggatgtc aatcaacagc aacaacaaca aaaccagctc      540
gtggaacgta tagcacgtag agcttctta catcgcttct ttgctaaacg taaagacagg      600
gctgtggcta gagctccata ccaagttaac caaaatgggtg gtggtcatca ttatctccg      660
aagccagaga ctgtacctgg tcaacagcta gagcaggac agtcgtcaca accacaacga      720
ccggctcaac ccaaaccaga atgtgataaa gatatgttga tggaaagtaa ggaagaaggc      780
cagtgttcga aagatctcga acttaggcta taa      813

```

<210> 3

<211> 1825

10 <212> ADN

<213> *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*

<400> 3

```

gaggcttaca ggttcaacca tttcagtaga acctccaac atctggaac gatcaaagga      60
gcaactcttt gacagccgta cgatcaaaac tcatttgaca catctcagtt tctcactgac      120
ttcctctcag tcatcagctt tctccttctc tttcttcaga tctctgcttc ttctcctcgg      180
tttcaatgtc gctccatctt cttctccttc ttctgctact atcccttgga gcaccttctt      240
tgctccaagc gtcggtgcat gagtaccgta gcgagagatt catgtccaaa ggcaacgcct      300
ttgtcttcca cggcggcagt gaaggcatct actcctcttc tccctccgac aacttctcct      360

```

15

ES 2 627 330 T3

ccgactctga ttccctctcc tcctttatcc ggtaaagtcc tatgattccg tttctttaac 420  
 taaagtttcc tcttttaaat ctgcttagga tctgactttg taatcagaac ccattaggat 480  
 tcttcgtcta cgagttggat cttagagctg attaagttcg tttgtataca gttcttagct 540  
 gtttctcggg gaaagtttct tactttgaaa ctctgtgtgt gtcctctctg agtaagcatt 600  
 gcttccacgt gtcaaagatt tgaactttca ttgtgttttg agtaaaatct tagctgtttc 660  
 tctgtaaaag tttctaactt tgaactctg tttgtatcct ctctgagtaa acatttcttc 720  
 cacgtgtcaa aagagctgaa ctttcctcgt gtttgagtaa catcttagct gtttctctgt 780  
 gaaagcttct tactttgaaa ctctgtgtgt gtcctctctg agtaaacatt gcttccacgt 840  
 gtcaaagagt tgaactttcc ttgtgtttga gtaacatctt agctgtttct ctgtgaaagt 900  
 ttcttacttg ctaatgcatt taacagtttt gagaagatca cattccggag acccgaggaa 960  
 gcttccaaca cctcttcatt acctatccac gccgtccttt tcgaggtaga agacagggag 1020  
 aacatcggag gatcagctta cgggtggcag agagctgtct gctgcacatc tgatctcgcc 1080  
 aaactcggtg tttgctcaca cggagagatc atccaccatc cttcttctaa agactcctcc 1140  
 tggcctcaag tcttcgggtg ttcccttggt gagaatgatt tgtctgctac gctgcttaca 1200  
 agatcgattc agatcactag gacaggaatg tataacctct acttcatcca ctgtgatcct 1260  
 gctctcaagg acttggtcgt tgaaggcaaa accatctgga aaaaccctgg aggatactta 1320  
 ccaggtagaa tggctccggt gatgtacttc tacgggttca tgtctctcgc ctttgtgctc 1380  
 ctcgagatct tctggttctc ccagtgcgct aggttctgga gagaagtgct toccttgag 1440  
 aactgtgtaa ctttagtgat aacgcttggg atgtgcgaga tggcgctttg gtacttcgac 1500  
 tacgctgagt tcaacgagac tgggtgtaga ccaacggtga tcaccgatg ggcagtcacg 1560  
 tttgggtgta tcaaacgcac gtgcgcacgt gtcacatcc ttatggtttc gatgggttac 1620  
 ggtgtcgtga ggctacgct tgggtgggtt acatcgaagg tgatcatgct tgggtgctact 1680  
 ttcttcgctg cttccgagac tcttgagctg ttggagaatg ttggtgcggt tagtgacttc 1740  
 tcagggaaag cgagactggt tttggttctc cccgttgcgg tgttgatgc tttcttcac 1800  
 atatggatat tcaagtcgct ttcgg 1825

<210> 4  
 <211> 270  
 <212> PRT

5 <213> *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*

<400> 4

ES 2 627 330 T3

Met Ser Arg Asn Glu Asp Gly Glu Ala Pro Pro Pro Glu Lys Ser Asn  
1 5 10 15

Phe Thr Arg Arg Cys Ser Leu Leu Ser Arg Tyr Leu Lys Glu Lys Gly  
20 25 30

ES 2 627 330 T3

Ser Phe Gly Asn Ile Asp Leu Gly Leu Val Arg Lys Pro Gly Pro Asp  
35 40 45

Leu Gly Leu Pro Gly Asn Ser Asp Gln Gln Glu Lys Gln Asn Val Met  
50 55 60

His Lys Ala Asn Ser Glu Leu Lys Ala Val Asn Val Leu Gly Glu Pro  
65 70 75 80

Ser Ser Ser Phe Gly Gly Lys Ala Lys Ala Thr Asn Leu Ser Glu Pro  
85 90 95

Ser Glu Pro Ile Ser Ser Gln Leu Thr Ile Phe Phe Gly Gly Lys Val  
100 105 110

Leu Val Tyr Asn Glu Phe Pro Ser Asp Lys Ala Lys Glu Ile Ile Gln  
115 120 125

Val Ala Lys Glu Ala Lys Ser Val Thr Asp Ile Asn Ile Gln Thr Gln  
130 135 140

Ile Asn Val Gln Lys Asp His Asn Lys Ser Asn Ile Val Leu Pro Asp  
145 150 155 160

Leu Asn Glu Pro Thr Asp Thr Ala Asp Val Asn Gln Gln Gln Gln  
165 170 175

Gln Asn Gln Leu Val Glu Arg Ile Ala Arg Arg Ala Ser Leu His Arg  
180 185 190

Phe Phe Ala Lys Arg Lys Asp Arg Ala Val Ala Arg Ala Pro Tyr Gln  
195 200 205

Val Asn Gln Asn Gly Gly Gly His His Tyr Pro Pro Lys Pro Glu Thr  
210 215 220

Val Pro Gly Gln Gln Leu Glu Gln Gly Gln Ser Ser Gln Pro Gln Arg  
225 230 235 240

Pro Ala Gln Pro Lys Pro Glu Cys Asp Lys Asp Met Leu Met Glu Val  
245 250 255

Lys Glu Glu Gly Gln Cys Ser Lys Asp Leu Glu Leu Arg Leu  
260 265 270

# ES 2 627 330 T3

<210> 5  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5 <220>  
<223> cebador directo  
  
<400> 5  
10 aagaagccaa gtctgtga 18  
  
<210> 6  
<211> 18  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> cebador inverso  
20 <400> 6  
tcggaggata atgatgac 18

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para mejorar la resistencia a la sequía en una planta que comprende proporcionar o aumentar la expresión de una proteína de resistencia a la sequía de origen vegetal, que es:
- 5
- (a) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ID DE SECUENCIA N.º:4; o
  - (b) una proteína derivada de la proteína de (a) por sustitución, delección o adición de 1-50 residuos en la secuencia de aminoácidos de ID DE SECUENCIA N.º:4 y que es capaz de conferir resistencia a la sequía a una planta; o
  - (c) una proteína derivada de la proteína de (a), que tiene al menos una identidad de secuencia del 70 % con la
- 10 secuencia de aminoácidos de ID DE SECUENCIA N.º:4 y que es capaz de conferir resistencia a la sequía a una planta, en dicha planta.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende transformar dicha planta con un polinucleótido que codifica una proteína de resistencia a la sequía de origen vegetal, que es:
- 15
- (a) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de ID DE SECUENCIA N.º:4; o
  - (b) una proteína derivada de la proteína de (a) por sustitución, delección o adición de 1-50 residuos en la secuencia de aminoácidos de ID DE SECUENCIA N.º:4 y que es capaz de conferir resistencia a la sequía a una planta; o
  - (c) una proteína derivada de la proteína de (a), que tiene al menos una identidad de secuencia del 70 % con la
- 20 secuencia de aminoácidos de ID DE SECUENCIA N.º:4 y que es capaz de conferir resistencia a la sequía a una planta.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el polinucleótido se incorpora en el genoma de la planta.
- 25
4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, que comprende:
- (1) proporcionar una cepa de *Agrobacterium* que contiene un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la proteína de la reivindicación 1;
  - (2) proporcionar una célula, órgano o tejido vegetal;
  - (3) poner en contacto la célula, órgano o tejido vegetal del paso (2) con la cepa de *Agrobacterium* del paso (1) de tal manera que el polinucleótido que codifica la proteína se introduzca en la célula, órgano o tejido vegetal;
  - (4) opcionalmente, seleccionar una célula vegetal;
  - (5) hacer crecer una planta a partir de la célula, órgano o tejido vegetal.
- 35
5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que después de la introducción del polinucleótido en la célula, órgano o tejido vegetal, el polinucleótido se integra en el genoma de la célula, órgano o tejido vegetal.
6. Uso de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la proteína de la
- 40 reivindicación 1 para proporcionar una planta con resistencia mejorada a la sequía.



Figura 1

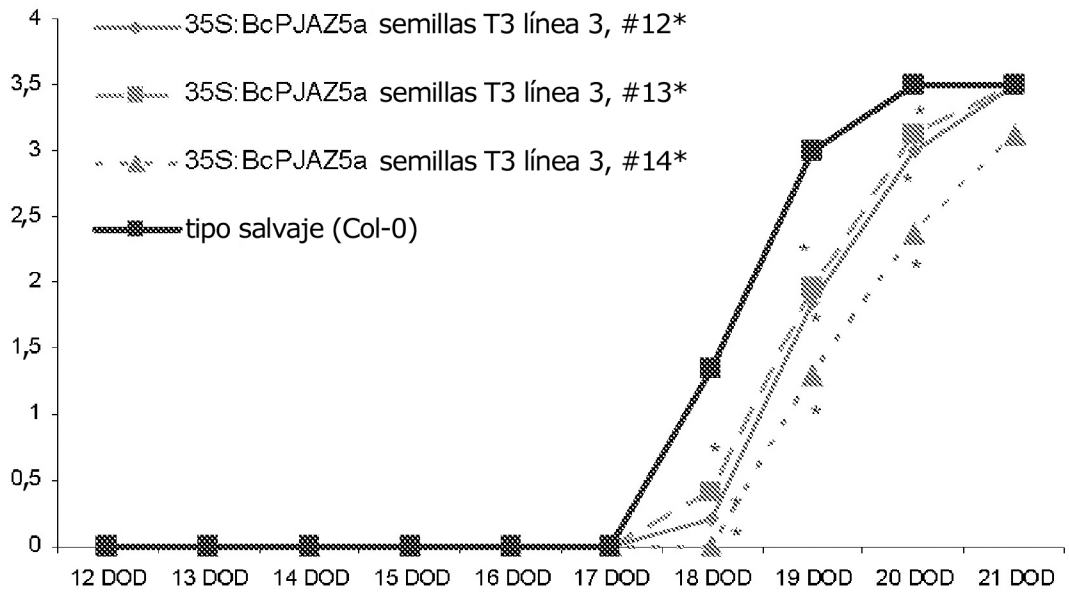
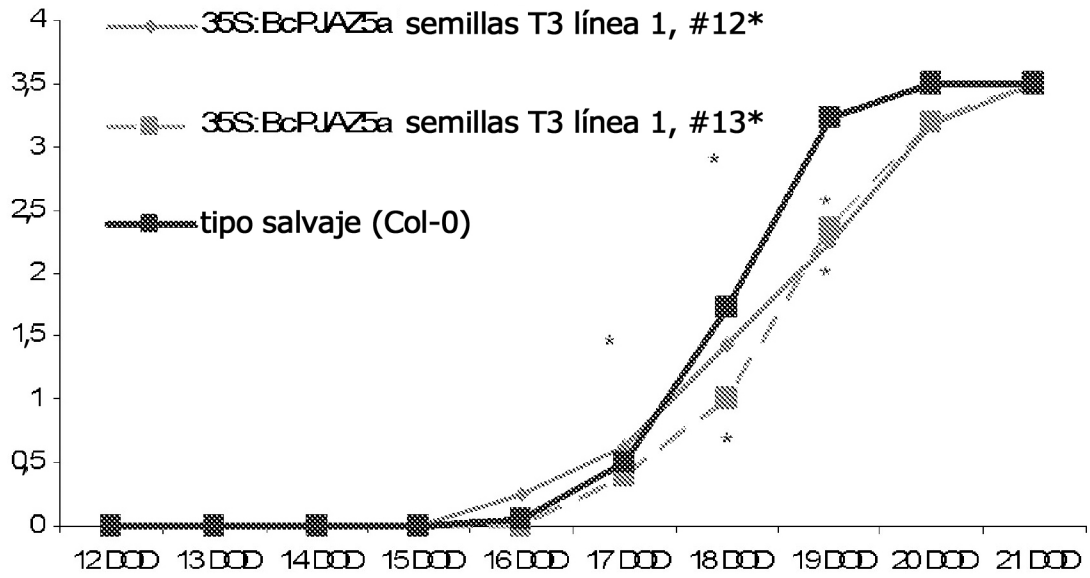


Figura 2

