

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 826**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05786884 .6**
96 Fecha de presentación: **02.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1789563**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.05.2007**

54 Título: **Promotor específico de las raíces y específico del parénquima xilemático**

30 Prioridad:
03.09.2004 DE 102004043207

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.04.2012

73 Titular/es:
**KWS Saat AG
Grimsehlstrasse 31
37555 Einbeck, DE**

72 Inventor/es:
**HEHL, Reinhard;
OLTMANN, Heiko y
STAHL, Dietmar Jürgen**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 378 826 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).

DESCRIPCION

Promotor específico de las raíces y específico del parénquima xilemático

5 La presente invención se refiere a un promotor y a su uso, así como a plantas transgénicas.

Las plantas superiores contienen un sistema de conductos, el xilema, en el que tiene lugar el transporte ascendente de agua y sales nutritivas.

10 La carga del xilema en la raíz se regula mediante el parénquima xilemático, que cubre las fibras de xilema. Por tanto, las células del parénquima xilemático de las raíces representan un punto de control importante para la entrada de sustancias en el xilema. Las células del parénquima xilemático contienen para este fin bombas de protones específicas, canales de agua y canales de iones.

15 Con su importancia fisiológica para el metabolismo, el parénquima xilemático abre una serie de posibilidades de realizar modificaciones genéticas en las plantas. Las influencias en el transporte de nutrientes se podrían realizar, por ejemplo, mediante determinadas proteínas, que son activas principalmente en el parénquima xilemático.

20 Ya se conocen promotores que son activos, entre otras, en las células del parénquima xilemático. De hecho, ni la actividad de estos promotores se limita exclusivamente a las células del parénquima xilemático (documento EP 1 207 204 A1), ni los promotores son activos principalmente en las raíces. Así, la actividad del promotor Sultr2.1 también se puede detectar en el floema de las hojas (Takahashi y col. 2000) y el promotor SOS1 también está activo en las células terminales de las puntas de las raíces (Shi y col., 2002). El promotor I2 del gen de resistencia I2 del tomate está activo principalmente en las células del parénquima xilemático del brote y al mismo tiempo también en la raíz, la hoja y el fruto del tomate (Mes y col., 2000). El transportador de aminoácidos AAP6 de alta afinidad procedente de *A. thaliana* se expresa en las células del parénquima xilemático de todos los vasos de la raíz y la hoja a través del promotor AAP6 (Okumoto y col., 2002). Los análisis Blot de ARN muestran que el gen AAP6 se expresa intensamente en raíces, hojas caídas y hojas caulinares y se expresa débilmente en brotes y flores (Rentsch y col. 1996).

30 Sakuta y Satoh, 2000, describen proteínas CRGRP ricas en glicina cuya función fisiológica aún no está clara, suponiéndose que las proteínas CRGRP contribuyen a reforzar la pared de los vasos del xilema. Kloos y col., 2002, describen entre otras cosas el aislamiento y el análisis molecular del gen de una proteína "similar a la taumatina" (Tlp) procedente de la remolacha azucarera, que se expresa específicamente en la raíz pivotante. En ambos documentos los promotores no se conocen. Por tanto, es objetivo de la presente invención influir en los rendimientos metabólicos de una planta específicamente en la zona del parénquima xilemático de las raíces.

35 Según la invención, el objetivo propuesto se alcanza mediante un promotor conforme a las características de la reivindicación 1.

40 Algunos de los términos usados en esta solicitud se explican más detalladamente a continuación:

45 Se entiende por promotor una secuencia de ácidos nucleicos que controla la expresión de un gen, dado el caso dependiendo de factores endógenos y exógenos. Entre estos factores se cuentan, por ejemplo, inductores, represores y proteínas similares que se unen al ADN, aunque también influencias ambientales. Un promotor puede constar de varios elementos. Sin embargo, comprende al menos un elemento regulador que es responsable de la transcripción del gen que se encuentra bajo su control.

50 Un promotor que es más activo en las células del parénquima xilemático de las raíces de la planta que en otras células de la planta presenta, por ejemplo en las raíces, una actividad medible mediante Blot de ARN, que para condiciones de ensayo comparables se puede detectar un 20% menos, preferiblemente un 10% menos y en particular un 5% menos en órganos superficiales de las plantas, como peciolos, hojas y flores. Esta especificidad no se limita a un determinado momento del ensayo sino que se da fundamentalmente durante todo el tiempo de vegetación.

55 Son "derivados" de un promotor las versiones acortadas o alargadas o idénticas sección por sección u homólogos de este promotor con las mismas propiedades o propiedades esencialmente iguales.

60 "Inducibilidad por patógenos" representa el efecto de factores externos en una planta, que provocan una reacción de defensa en la misma. Así, puede tratarse de ataques de insectos (mordiscos), bacterias, hongos, nematodos u otros patógenos, pero también de efectos abióticos, como heridas mecánicas o estrés hídrico o salino.

65 "Efecto antifúngico directo" significa que los productos génicos actúan directamente como antifúngicos, de modo que, por ejemplo, disuelven paredes celulares o codifican para fitoalexina sintasas o para metabolitos que actúan inhibiendo el metabolismo de los hongos.

- 5 “Efecto antifúngico indirecto” significa que los productos génicos activan las defensas génicas vegetales. A estos genes pertenecen, por ejemplo, los genes de resistencia, componentes de la transducción de señal (como quinasas, fosfatasa), factores de transcripción o enzimas que producen sustancias señal (como enzimas formadores de etileno, formadores de ácido salicílico o formadores de jasmonato, enzimas formadores de especies de oxígeno reactivas, enzimas formadores de monóxido de nitrógeno).
- 10 Por “infección” se entiende el instante de tiempo más temprano en el que el metabolismo del hongo (o el crecimiento del hongo) se prepara para una penetración del tejido huésped. A ésta pertenecen, por ejemplo, el crecimiento de hifas o la formación de estructuras de infección específicas, como las hifas de penetración y los apresorios.
- 15 La expresión “homología” representa aquí una homología de al menos el 70% a nivel de ADN, que se puede determinar según procedimientos conocidos, por ejemplo, la comparación de secuencias computerizada (S. F. Altschul y col., 1990), la herramienta de búsqueda Basic Local Alignment, J. Mol. Biol. 215: 403-410).
- 20 “Secuencia de nucleótidos complementaria” significa, referido a ADN bicatenario, que la segunda cadena de ADN complementaria a la primera cadena de ADN según las reglas de combinación de bases presenta bases nucleótidas que se corresponden con las bases de la primera cadena.
- 25 El término aquí empleado “hibridar” significa hibridar bajo condiciones convencionales, como las descritas por Sambrook y col. (1989), preferiblemente bajo condiciones astringentes. Por ejemplo, son condiciones de hibridación astringentes: hibridación en 4 x SSC a 65°C y a continuación lavados múltiples en 0,1 x SSC a 65°C durante un total de aproximadamente 1 hora. Son condiciones de hibridación menos astringentes, por ejemplo: hibridación en 4 x SSC a 37°C y a continuación lavados múltiples en 1 x SSC a temperatura ambiente. “Condiciones de hibridación astringentes” también puede significar: hibridar a 68°C en fosfato sódico 0,25 M, pH 7,2, SDS 7%, EDTA 1 mM y BSA 1% durante 16 horas y a continuación doble lavado con 2 x SSC y SDS 0,1% a 68°C.
- La invención se describe más detalladamente a continuación y haciendo referencia a las figuras y ejemplos.
- 30 El promotor según la invención está activo en células del parénquima xilemático de las raíces de plantas. Por el contrario, en los órganos superficiales de la planta en cuestión no se detecta actividad, o sólo muy baja. Esta propiedad se puede utilizar para la mejora de los procesos de carga y descarga del xilema de la raíz y por tanto, para la mejora del metabolismo. Por eso, usando el promotor se pueden preparar también plantas transgénicas y partes de estas plantas, como semillas.
- 35 El promotor según la invención se puede emplear para mejorar el metabolismo del nitrógeno de las plantas. Para ello se sobre-expresan genes de proteínas de transporte para nitrato y aminoácidos en las células del parénquima xilemático y se refuerza la carga del xilema con los compuestos de N. Otra mejora del metabolismo del N supone el depósito reducido de “nitrógeno dañino” en los órganos de almacenamiento de la planta. Altas concentraciones de compuestos de N en los órganos de almacenamiento a menudo reducen el valor fisiológico alimentario de productos de cultivo o dificultan el aislamiento de sustancias de almacenamiento como sucrosa a partir de las raíces de la remolacha azucarera. Se puede conseguir un depósito reducido de “nitrógeno dañino” en la raíz mediante una emisión reforzada de aminoácidos al xilema y el transporte en los órganos vegetales superficiales.
- 40 El promotor según la invención se puede emplear para mejorar la tolerancia al estrés hídrico de las plantas. La concentración de la fitohormona ácido abscísico (ABA) aumenta en las raíces en reacción al secado de la tierra. El ABA es transportado a través del xilema desde las raíces a las hojas, donde produce un cierre de los estomas. Mediante un control de la expresión del transportador de ABA en las células del parénquima xilemático se puede regular la entrada de ABA en el xilema y mejorar la tolerancia al estrés por secado de las plantas.
- 45 El promotor según la invención se puede emplear para reducir la concentración de cationes sodio (Na^+) y potasio (K^+) en la raíz de la remolacha azucarera. La concentración Na^+/K^+ determina la calidad de procesado de remolachas azucareras en referencia a la obtención técnica de azúcar (Schiweck y col., 1984). A las moléculas de transporte de Na^+ y K^+ en las células del parénquima xilemático de la raíz les corresponde una posición clave para mantener una concentración Na^+/K^+ baja en las raíces de la remolacha azucarera. Con ayuda del promotor se puede llevar a cabo procedimientos apropiados para mantener baja la concentración Na^+/K^+ , por ejemplo la sobre-expresión del antiportador Na^+/H^+ SOS1 (Shi y col., 2002) en las células del parénquima xilemático. Por otro lado, la carga del xilema con K^+ se regula separadamente de la absorción de K^+ del suelo. Mientras que AKT1 es responsable de la absorción de K^+ del medio, la carga de K^+ del xilema se realiza mediante la molécula de transporte SKOR (stelar K^+ outward rectifier, canal de K^+ rectificador de salida de la estela). La sobre-expresión dirigida de SKOR (Gaymard y col., 1998) conduciría a un transporte reforzado de K^+ de la raíz.
- 50 El promotor según la invención también se puede emplear para mejorar la resistencia de la planta frente a las enfermedades. Numerosos hongos del suelo de las especies *Fusarium oxysporum* o *Verticillium* spp. emplean el xilema para la propagación por la planta. Mediante la combinación del promotor inducible por patógenos con un gen cuyo producto génico ejerce un efecto antifúngico directo o indirecto se puede impedir que continúe la propagación de un hongo en el xilema y de este modo se produce una resistencia a los hongos. Así, la “inducibilidad por
- 65

patógenos" del promotor juega un papel especial en la consecución de una cantidad de expresión crítica para la eficacia del principio activo antifúngico en el parénquima xilemático.

5 Las infecciones virales de la remolacha azucarera a menudo se limitan sólo a un órgano como la raíz o las partes superficiales de la planta. Así, el virus BNYW infecta y coloniza en primer lugar la raíz de la remolacha y los virus del amarillero BMYV y BYV se encuentran sólo en las hojas. El promotor específico de las raíces se puede emplear ahora para transformar de forma organo-específica los conceptos de resistencia a los virus referentes a la técnica de silenciamiento de genes o de antisentido.

10 La figura 1 muestra la expresión específica de las raíces del gen 2-1-88 mediante un experimento Blot de ARN. Respectivamente 10 µg de ARN celular total, aislados de los órganos de remolachas azucareras floridas de 2 años, se separaron en un gel de agarosa-formaldehído desnaturalizante. El ARN se aisló de las hojas, la raíz pivotante, los brotes y las flores. El fragmento de ADNc Smart 2-1-88 se usó como sonda de hibridación.

15 La Figura 2 muestra el vector del gen reportero 2-1-88-GUS con una fusión translacional entre el promotor (SEC. ID. Nº 1) y el gen GUS de *E.coli*. El promotor en el vector 2-1-88-GUS se insertó como fragmento HindIII-NcoI y comprende las posiciones de nucleótido 1-2502 de la secuencia de nucleótidos SEC. ID. Nº 1.

20 La Figura 3 muestra el vector del gen reportero 2-1-88-LUC con una fusión translacional entre el promotor (SEC. ID. Nº 1) y el gen luciferasa de *Photinus pyralis*. El promotor 2-1-88 en el vector 2-1-88-LUC comprende las posiciones de nucleótido 1-2502 de la secuencia de nucleótidos SEC. ID. Nº 1.

La Figura 4 muestra la organización modular del promotor (SEC. ID. Nº 1) y la distribución de los elementos cis.

25 La Figura 5 muestra el vector binario 2-1-88-luc-kan que se usó para la transformación de la remolacha azucarera.

La Figura 6 muestra la actividad luciferasa específica de la construcción del gen reportero 2-1-88-luc-kan en el extracto de raíces y hojas de remolachas azucareras transgénicas jóvenes y viejas (WP4), así como la actividad de la línea de partida no transgénica (control). La escala del eje Y es logarítmica.

30 La Figura 7 muestra la distribución espacial de la actividad luciferasa en la sección transversal de la raíz de la línea WP4-15 de remolacha azucarera transgénica en comparación con la línea de partida no transgénica (control). Las preparaciones de raíces se fotografiaron iluminadas (izquierda) y después se documentó la emisión de luz de las preparaciones de raíces en la oscuridad (derecha). La posición e intensidad de la emisión de luz se correlaciona con la actividad del promotor (SEC. ID. Nº 1) en la raíz del transformante WP4-15 (abajo a la derecha). La línea de partida no transgénica no muestra emisión de luz (arriba a la derecha).

35 La Figura 8 muestra una toma microscópica detallada de la preparación de la raíz transgénica WP4-15 de la Figura 7. En la mitad izquierda de la imagen se observa la superficie de la raíz iluminada. Las hebras de los vasos formadas por floema y xilema aparecen como ranuras negras. En la mitad derecha de la imagen se presenta la localización de la emisión de luz para las hebras del xilema. Esta foto se tomó en la oscuridad, de modo que sólo se pudo medir la emisión de luz del objeto.

40 La Figura 9 muestra una superposición de la mitad derecha y la izquierda de la imagen de la Figura 8. La actividad del gen reportero luciferasa aparece en rojo en esta representación. La actividad del gen reportero se limita a la capa celular entre el xilema y el floema o la zona inmediata al xilema de las células del parénquima xilemático.

45 La Figura 10 muestra el vector del gen reportero pUBI mínimo con el promotor mínimo del promotor ubiquitina del maíz.

50 Caracterización del promotor 2-1-88

El promotor (SEC. ID. Nº 1) procede de un gen de remolacha azucarera 2-1-88 no conocido hasta ahora y en lo sucesivo denominado también promotor 2-1-88. El análisis de este promotor con ayuda de la base de datos PLACE (Higo y col., 1999) muestra que se detectan numerosos elementos cis para la inducibilidad por patógenos, la especificidad de las raíces, así como la capacidad de respuesta al estrés hídrico y por frío (Tabla 1). Un elemento característico de la respuesta a patógenos es W-box, que se encuentra una vez como W-box "clásico" (Rushton y col., 2002) y cuatro veces como W-box NPR1 (Yu y col., 2001) en el promotor (Fig. 4). Junto al motivo de núcleo TTGACC o TTGAC, respectivamente los 15 nucleótidos en sentido ascendente y descendente del motivo de núcleo W tienen un significado importante para la inducibilidad por patógenos en combinación con el motivo del núcleo. Además, está disponible el Box-A del promotor PcPAL inducible por patógenos. La especificidad del promotor por las raíces se determina a través de los numerosos motivos específicos de la raíz (Wurzel Box ATATT) y los elementos cis para la respuesta a auxina (Aux-IAA4 y Aux-SAU15A) (Guilfoyle y col., 1998). La inducibilidad por estrés hídrico, salino y por frío del promotor se atribuye a la presencia de los sitios de unión MYC y MYB (Abe y col., 2003) que están involucrados en la transducción de señal de ABA.

Fusión del promotor 2-1-88 con el gen luciferasa de *Photinus pyralis*

Para comprobar la actividad del promotor 2-1-88 en remolacha azucarera, el promotor se fusionó translacionalmente con el gen luciferasa de *Photinus pyralis* y se transformó en la remolacha azucarera. Para ello el vector 2-1-88-GUS se linealizó en primer lugar mediante una rotura Sacl con posterior reacción de relleno de T4-ADN-polimerasa. Mediante la posterior digestión con NcoI se liberó el gen GUS. En el vector así preparado se clonó el gen luciferasa de *Photinus pyralis* (Promega, Mannheim Alemania) como fragmento NcoI-BglIII (rellenado). El vector resultante lleva la denominación 2-1-88-LUC (Fig. 3) y contiene una fusión translacional entre el promotor 2-1-88 y el gen luciferasa.

Para la transformación de la remolacha azucarera se clonó el casete de expresión compuesto por el promotor 2-1-88 y el gen luciferasa en el vector binario pGPTV-kan (Becker y col., 1992). Para ello la combinación promotor 2-1-88 - gen luciferasa se cortó con PvuII y HindIII del vector 2-1-88-LUC y se clonó en el vector binario pGPTV-kan linealizado con HindIII y SmaI. El vector formado lleva la denominación 2-1-88-luc-kan (Fig. 5). El vector 2-1-88-luc-kan se transformó en la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido residente pGV2260 mediante un procedimiento directo de transformación de ADN (An, 1987). La selección de clones recombinantes de *A. tumefaciens* se realizó usando el antibiótico kanamicina (50 mg/l).

La transformación de la remolacha azucarera se realizó según Lindsey y col. (1991) usando el antibiótico kanamicina. La transgenicidad de las plantas se comprobó por PCR. El uso del cebador GTGGAGAGGCTATTCGGTA y CCACCATGATATTCGGCAAG condujo a la amplificación de un fragmento de ADN de 553 pb del gen *npII*. El PCR se realizó usando 10 ng de ADN genómico, una concentración de cebador de 0,2 μ M a una temperatura de recocido de 55°C en un multiciclador PTC-200 (MJ Research, Watertown, EUA).

Detección de la actividad del promotor 2-1-88 en raíces de remolacha azucarera transgénica

Remolachas azucareras transgénicas que fueron transformadas con la construcción del gen reportero 2-1-88-luc-kan se cultivaron bajo condiciones de invernadero. La actividad del promotor se analizó en raíces y hojas de remolachas azucareras jóvenes y viejas mediante mediciones del gen reportero.

La actividad luciferasa de *Photinus pyralis* se determinó con el Luciferase Assay System (Promega, Mannheim, Alemania) en un luminómetro Sirius (Berthold Detection System GmbH, Pforzheim, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la obtención de un extracto de enzima apropiado para la medición se determinó en primer lugar el peso de las muestras de tejido. Las muestras de hojas se homogeneizaron añadiendo arena de mar con 10 veces el volumen (v/p) de Passive Lysis Buffer (PLB, tampón de lisis pasivo) en un mortero y las muestras de raíces se homogeneizaron en un aparato comercial de cocina (Warring Blender). El sobrenadante líquido se transfirió a un recipiente Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó 5 min a 4°C y 20000 g. Se extrajo el sobrenadante claro y se emplearon 10 μ l de extracto crudo para la medición de la actividad luciferasa de *Photinus*.

Mientras el promotor (SEC. ID. N° 1) se expresó de forma intensa o muy intensa en las raíces jóvenes y viejas de 9 transformantes independientes, la actividad del gen reportero de 7 transformantes (WP4-2, WP4-5, WP4-6, WP4-8, WP4-9, WP4-12, WP4-16) en comparación con la línea de partida no transgénica apenas se detectó en las hojas de plantas jóvenes y no se detectó en las hojas de plantas viejas (Figura 6). Así, según los resultados del estudio del gen reportero, en coincidencia con los estudios de Blot de ARN, el promotor (SEC. ID. N° 1) se expresa principalmente en la raíz de la remolacha azucarera.

El promotor 2-1-88 está activo específicamente en las células del parénquima xilemático de la raíz de la remolacha azucarera

Para analizar la distribución espacial de la actividad del promotor en las raíces de la remolacha azucarera se realizaron secciones transversales y longitudinales de raíces de remolacha y las secciones de raíces se incubaron 2-4 h a temperatura ambiente en una solución de Luciferina 100 μ M + DMSO 5%. A continuación se detectó la emisión de luz de las secciones de raíces atribuida a la actividad luciferasa, con ayuda de una cámara MicroMAX Digital CCD (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Alemania).

El análisis de las secciones transversales muestra que la actividad del promotor se asocia con la posición de los vasos en los anillos de cámbium individuales de la raíz (Figura 7). Para un análisis detallado se empleó el estereomicroscopio Stemi 2000 (Zeiss, Alemania) con ayuda de un adaptador HRD Mikroskop en la cámara. Según los análisis microscópicos la actividad del promotor en las células del parénquima xilemático está limitada entre xilema y floema o a las células del parénquima xilemático que rodean el xilema (Fig. 8 y 9).

Con el promotor según la invención se pueden fabricar plantas transgénicas con propiedades especiales:

- a. Procesos mejorados de carga y descarga del xilema en la raíz
- b. Abastecimiento mejorado de nitrógeno
- c. Acumulación reducida de "nitrógeno dañino" en la raíz
- d. Resistencia mejorada a la sal

- e. Resistencia mejorada al estrés por sequedad
- f. Tolerancia mejorada al hielo
- g. Concentración Na⁺/K⁺ modificada en la raíz
- h. Aumento de la resistencia/tolerancia frente a patógenos

5

El promotor 2-1-88 es inducido en las células del parénquima xilemático mediante estrés biótico y abiótico

10

Remolachas azucareras WP4 transgénicas que fueron transformadas con la construcción del gen reportero 2-1-88-luc-kan se infectaron con el hongo parasitario *Fusarium oxysporum* f. sp. *betae*, bajo condiciones de invernadero. *Fusarium oxysporum* f. sp. *betae* es un patógeno de los vasos de la remolacha, que se propaga en el sistema xilemático de la planta y provoca el marchitamiento por *Fusarium*. 4 semanas tras la infección se cuantificó la actividad del gen reportero luciferasa en las raíces infectadas. La actividad del gen reportero fue claramente más elevada en las raíces infectadas en comparación con las plantas transgénicas no infectadas. Por tanto, el promotor 2-1-88 es inducido por el ataque de patógenos. El análisis de la distribución espacial de la actividad del gen reportero con ayuda de la cámara CCD mostró que la actividad del promotor fue claramente mayor en las células del parénquima xilemático que rodean el haz infectado del xilema.

15

Modificación del metabolismo del nitrógeno de las plantas

20

El metabolismo del nitrógeno de las plantas se puede mejorar en varios aspectos mediante el uso del promotor según la invención. El aumento o disminución específico del número de proteínas de transporte apropiadas en las células del parénquima xilemático de la raíz mejora la absorción y el transporte de compuestos de N en las plantas.

25

Mediante la expresión específica de la raíz de los genes de la proteína de transporte para iones nitrato en el parénquima xilemático se puede aumentar la absorción de nitrógeno del suelo y mejorar el aprovechamiento de los fertilizantes de N. El transporte de nitrato mejorado en las partes superficiales de la planta conduce a una producción reforzada de aminoácidos en las hojas. Un aprovechamiento eficaz de los compuestos de N ya reducidos a aminoácidos en la raíz sirve para la expresión específica del parénquima xilemático del transporte de aminoácidos a través del promotor.

30

Otra mejora del metabolismo del N representa el almacenamiento reducido de "nitrógeno dañino" en los órganos de reserva de la planta. Las concentraciones elevadas de compuestos de N en los órganos de reserva a menudo reducen el valor fisiológico alimentario de los productos de cultivo o dificultan el aislamiento de sustancias de reserva como la sucrosa de las raíces de la remolacha azucarera. Se puede obtener un almacenamiento reducido de "nitrógeno dañino" en las raíces de la remolacha azucarera mediante una emisión reforzada de aminoácidos desde la raíz hacia las partes superficiales de la planta sobre el xilema. Para ello se sobre-expresan los correspondientes transportadores de aminoácidos.

35

Aumento de la tolerancia frente a virus fitopatógenos

40

Numerosos virus fitopatógenos de la remolacha azucarera presentan especificidad por órganos, es decir, habitualmente la proliferación viral no se produce en toda la planta sino solamente en un órgano o tipo de tejido determinado. Igualmente los daños que produce la infección vírica se limitan por regla general a los órganos afectados. Son gérmenes patógenos víricos de la remolacha azucarera con especificidad por órganos, p. ej., BNYW con preferencia por la raíz y BMVY y BYV restringidos a las hojas de remolacha.

45

El promotor según la invención se puede emplear para desarrollar en la remolacha azucarera una resistencia a BNYW específica de la raíz. De este modo, para la implementación de la estrategia de resistencia a los virus dependiente de la silenciación de genes, se combina con el promotor una secuencia parcial de ADN nativa o mutagenizada del genoma viral de BNYVV. La combinación entre la secuencia del promotor y la secuencia de ADN viral se construye de modo que la transcripción de la secuencia de BNYVV conduce a una silenciación génica eficaz contra BNYVV. La eficacia de este enfoque se determina mediante un análisis del título viral en las plantas mediante el uso de un ensayo ELISA dirigido a la proteína que envuelve el BNYW.

50

Aumento de la tolerancia de plantas transgénicas frente a hongos fitopatógenos del suelo

55

El promotor según la invención también se puede emplear para, en combinación con un gen o una combinación de genes, acentuar un efecto antifúngico directo o indirecto en las raíces de las plantas. El efecto antifúngico conduce a un aumento de la resistencia a los hongos o de la tolerancia a los hongos, especialmente contra parásitos de los vasos como *Fusarium oxysporum* spp.

60

Para ello el promotor se fusiona translacional o transcripcionalmente con genes de la defensa patógena, cuyos productos génicos tienen un efecto antifúngico directo o indirecto. Las combinaciones del gen del promotor se clonan en el vector de transformación binario pGPTV y se transforman en remolacha azucarera, patata o colza mediante transformación mediada por *A. tumefaciens*. La transgenicidad de las plantas se comprueba por PCR como se ha descrito y la expresión de los genes en las raíces se verifica mediante estudios Blot de ARN. El aumento de la

65

resistencia frente a los hongos de las plantas se observa mediante ensayos de resistencia a los hongos.

Sorprendentemente la expresión inducida de genes de defensa frente a patógenos específica de la raíz y el parénquima xilemático no conduce a baja estatura o a una disminución del rendimiento observados a menudo en una expresión constitutiva en toda la planta (Heil y Baldwin, 2002). Otra ventaja de la expresión génica únicamente específica de las raíces es que los productos génicos que aportan resistencia sólo se forman en el órgano que se tiene que proteger. Así, determinadas partes de plantas como las semillas de colza permanecen libres de todos los productos transgénicos para la comercialización.

Los genes, cuyos productos tienen un efecto antifúngico indirecto necesitan un control de expresión particularmente cuidadoso para evitar las consecuencias negativas de una activación indeseada de las defensas vegetales. Un ejemplo de efecto antifúngico indirecto es el efecto que parte de la co-expresión de un gen de resistencia (R) vegetal en combinación con un gen avirulencia (avr) o de la sobre-expresión de un gen R autoactivado en una célula vegetal. La expresión conjunta del gen R y avr o la expresión singular de un gen R autoactivado conduce a una activación intensiva de las defensas vegetales y requiere una regulación estricta. La regulación se consigue de manera que el gen R o el gen avr se pone bajo el control del promotor según la invención.

Utilización del promotor según la invención en monocotiledóneas

Aunque el promotor también está activo en monocotiledóneas, se alcanza una actividad óptima del promotor en monocotiledóneas cuando el promotor mínimo de la remolacha azucarera incluido TATA-Box se completa mediante el promotor mínimo del promotor ubiquitina del maíz inclusive el intrón (SEC. ID. N° 2). Para ello se amplifica mediante PCR la SEC. ID. N° 1 de la posición 1-2459 y se clona en el vector pUBI-mínimo cortado con SmaI (Fig. 10).

Referencia:

Abe, H., Urao, T., Ito T, Seki, M., Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling: Plant Cell. 15 (1):63-78.

Altschul, S.F. y col. (1990). Basic Local Alignment search tool, J.Mol. Biol. 215: 403-410

An, G. (1987). Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. Methods Enzymol. 153, 292-305.

Becker D, Kemper E, Schell J, y Masterson R. (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. Plant Mol Biol. 20(6):1195-7.

Elmayan, T. y Tepfer M. (1995). Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. Transgenic Res. 4(6):388-96.

Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, Michaux- Ferriere N, Thibaud JB, Sentenac H. (1998). Identification and disruption of a plant shaker- like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. Cell 94, 647-655.

Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T., y Murfett, J. (1998). How does auxin turn on genes? Plant Physiol. 118(2): 341-7.

Heil, M. y Baldwin, I. T. (2002). Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. Trends Plant Sci. 2002 Feb;7(2):61-7.

Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. y Korenaga, T. (1999). Plant cis acting regulatory DNA elements (PLACE) 40 database:1999. Nucleic Acid Research 27: 297-300. Kloos, D.U. et al. (2002), Isolation and molecular analysis of six taproot expressed genes from sugar beet, J. Exp. Bot. 53 (373): 1533-1534. '

Lindsey, K., Gallois, P., y Eady, C. (1991) Regeneration and transformation of sugar beet by Agrobacterium tumefaciens. Plant Tissue Culture Manual B7: 1-13; Kluwer Academic Publishers.

Logemann, E., Pamiske. M., Hahlbrock, K. (1995). Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. Proc Natl Acad Sci USA. 1995 92(13):5905-9.

Mes JJ, van Doom AA, Wijbrandi J, Simons G, Comelissen BJ, y Haring MA. (2000). Expression of the Fusarium resistance gene I-2 colocalizes with the site of fungal containment. Plant J. 23(2):183-93.

Okumoto S, Schmidt R, Tegeder M, Fischer WN, Rentsch D, Frommer WB, y Koch W. (2002). High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of Arabidopsis. J Biol Chem. 277 (47):45338-46.

- 5 Rentsch D., Himer, B, Schmelzer, E., y Frommer W.B. (1996). Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permeasetargeting mutant. *Plant Cell*. 1996 Aug;8(8):1437-46.
- 10 Rushton, P.J., Reinstadler. A., Lipka. V, Lippok, B., y Somssich, I, E. (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell*. 14(4): 749-62.
- 15 Sambrook, J., Fritsch, E..F., y Maniatis, T (1989). In *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- Sakuta C. y Satoh S. (2000), Vascular Tissue-Specific Gene Expression of Xylem Sap Glycine-Rich Proteins in Root and Their Localization in the Walls of Metaxylem Vessels in Cucumber, *Plant Cell Physiol* 41 (5): 627-638.
- 20 Schiweck, H., Kozianowski, G., Anderlei, J. y Burba, M. (1984). Errechnung der Dicksaft- Nichtzuckermasse aus Rübenanalysen. *Zuckerindustrie* 119, 268-282.
- Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK. (2002). The putative plasma membrane Na(+)/H(+) antiporter SOS1 controls long-distance Na(+) transport in plants. *Plant Cell* 14, 465-477.
- 25 Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford MJ, y Saito K. (2000). The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*.23(2):171-82.
- Yu, D., Chen, C., y Chen, Z. (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell*. 2001 (7):1527-40.

30 Tabla 1: Organización de los elementos cis en el promotor 2-1-88
Los datos de posición se refieren al punto de inicio de transcripción (+1).

¹(+) = orientación directa hacia TATA-Box, (-) = orientación reversa hacia TATA-Box.

Elemento cis (secuencia)	Posición ¹	Función
TATA Box (TATAAA)	36- 41 (+)	Sitio de unión del complejo del factor de transcripción basal
Wurzel(raíz)-Box (ATATT)	84-88 (-), 287-291 (+) 295-299 (+), 296-300 (-) 341-345 (-), 415-419 (-) 455-458 (-), 587-591 (-) 627-631(-), 678-682 (+) 789-794 (-), 986-990 (+)	Elemento para la especificidad de la raíz del promotor rol D (Elmayan y Tepfer, 1995)
MYC Consensus (CANNTG, N=A,T,C,G)	166-171 (-) 794-799 (-) 825-830 (-)	Sitio de unión del núcleo MYB del promotor rd22 que responde al estrés por sequedad y otros genes (CBF3), que participa en la transducción de la señal de ABA y de frío (Abe y col., 2003)
W-Box (TTGACC)	222-227 (+)	Motivo del núcleo del sitio de unión WRKY de PcPR1-1 y PcPR1-2, suficiente para la inducción por patógenos de promotores sintéticos (Rhushton y col., 2002)
PAL-BoxA (CCGTCC)	364-369 (-) 574-579 (+)	Box A del promotor PcPAL que responde a patógenos (Longemann y col., 1998)
Aux-IAA4 (G/TGTCCC AT)	490-497 (-)	Elemento cis que responde a auxina del promotor PS-IAAA4/5 según Guilfoyle y col. (1998)
W-Box NPR1 (TTGAC)	804-808 (+) 1023-1027 (-) 2269-2273 (-) 2448-2452 (+)	Motivo del núcleo del sitio de unión WRKY de AtNPR1, responsable de la inducción por patógenos (Yu y col., 2001)
Aux-SAU15A (CATATG)	825-830 (+)	Elemento cis que responde a auxina del promotor SAUR15A según Guilfoyle y col. (1998)
MYB1AT	1100-1116 (+)	Sitio de unión de MYB del promotor rd22

(ATAACCA)

1170-1175 (-)

que responde al estrés por sequedad,
que participa en la transducción de la
señal de ABA (Abe y col., 2003)

PROTOCOLO DE SECUENCIA

- 5 <110> KWS SAAT AG
- <120> Promotor específico de la raíz y el parénquima xilemático
- <130> KWS0087
- 10 <140>
- <141>
- <160> 2
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <212> ADN
- <213> Maiz
- 20 <220>
- <221> señal TATA
- <222> (2462) .. (2467)
- 25 <400> 1

```

aagcttctcc tttgagaagg agaagtcagt attaccggtt caaaagggta ttgactattg 60
agtcaccgag gaatgcgact cttccaagaa tcatgattca agaattccat gtgacaaaag 120
gtcacgggaa ctagttaaag tgcaagttcc aaatctcgct tgtttttcgt ccctccgatt 180
gttaaatcag tccactcctt cctcatcttc catcattggt. atagtgtttg tcaaccatca 240
acaaaagaac ttcaatacac ttatttcaca atacggacct cttagattgag cagctttatc 300
taagtttgag ttatttatgt tattgtaatt gttatgtaac aacaagtaaa gctcaagtta 360
gtttctttgt ttttatttgg ttgcattagc gttaggatgt actttcattt ttaattaatg 420
caaaattctc cgtataaaaa aaaaagggat ccctctatgc cttcataaac tgcctaattt 480
ctgcaattga gatcccaaaa tagaaacaat gaatttgaaa cctaccaatt tgagtgtctg 540
gcctaagtcc taagaccaa gtcactctca atgacacacc caatctcacc gagtagatag 600
gtgatcacta gaaaatagag ataaatatga aacaattttc ttctttttgt gtaatttcaa 660
aagaaatatt tcaactgttt tagaacggat atatatatat atatatatat atatatatat 720
atatatatat atatatatat ataaaaagctc attagaaatt tgataataga actagtactt 780
ttttaatgta tcttgatggg ataaccttag cttgcaaaag cacactgacg ttggaatgct 840
gtcgtttgat gacattggca acatttcctt tcaatttttt cttccattat ctcattaatc 900
cactaggata ctagcctaata ggcccattaa tggcttctcat tggaaaaatg tattataaaa 960
tttattcttc atggaaatat aagaaaaggc cttctaatac tcccactctc ccaggtttgg 1020
aaagaaagtt gggcagataa agtttgagc tccaatcctt caagtcattt gtgactgaat 1080
actgtttatg ttatgttaat gggtaggct tgatgatcca aaaggtaaca aaggaaagtt 1140
ctacaatatc tcgcgaagat ttagttatag. agcttagtat aaaactgtat catattgaga 1200
atctattttt catggggata ccgatggag tcttagtggt catttggttg catacggaaa 1260
attacacttc ttagcaatat gtaattccca tgaaatttca tttcttatga agagtacata 1320
actgttttgg ttatatactt ttactatttt atgagaagtg aaattccaga aatttgtgtg 1380
tttttgtaa ccaaacaatc cttcatcttt atatttaaca agaacttaca tttcctatgt 1440
tttgtagtat caactaaacg attacttatt cttgagtcga tgtttaaatt taatactagg 1500
tagtgtgat ttatattatt atatacagat aattttctta tgatggtgca aataataatc 1560
ttttaataa aattgatgag tacatattga actatacgtg ttgatgtgcg gatacttcta 1620
aataagtttt atatacaact ttcttatgca tcacttcatt taataagaac aacatagat 1680
agcctagtgg tacattgaca taacatctga tattagaggt cccgggatcg agtcttacct 1740
tttgtagaaa ggatcctcaa tttttccct tcttgtaact tgcaagagac aaatcacttc 1800
ttttgatgat agatgatgcg atattatgag aaatgtcata cacaagataa ataattccat 1860
ttttactcga taatatataa ctcataattg tttctgataa ttcttatcaa taatatactc 1920
cctccgctct ctattagttt acccgatttc cttttaagag tgtctcttat tagtttacct 1980
ctttttatct tttgctatgt ttggaatggg accacaaact tttcatcaca cataaattca 2040
atthaatata aaataatagt ttctcttct ttatatgacc cacaatatta tttctcctaa 2100
aacttgtgcg aaagaaaggg gtaaactaat agaggacgga gggagtacat cattagtaat 2160
atatgggtac tcatgggtatg catagcgcac tttccatgca ataattttgc aatattgatc 2220

```

```

gactgatcaa catgcaaate aatcaccaa tcacaactcg gaactaaggt agtatttgac 2280
cccaatttat actggggaag tttcactttc agaaatacgt aaacacaaaa acaagtgcgt 2340
gcatgcgcat tggccattgg agtattgaag tatactctgt agaggataag caatgtcttg 2400
gtctttccaa tatcaatata tcattactta gtaatgatat ggtctgcctt ttcctatgct 2460
atataaacc tcaaatcttc taactctaaa acccaccaaa tc 2502

```

<210> 2

<211> 1151

<212> ADN

5 <213> Zea mays

<220>

<221> señal TATA

<220>

10

<220>

<221> intrón

<222> (129) .. (1133)

15

<220>

<221> promotor

<222> (1) .. (1147)

<400> 2

```

cttctctgcc cgccgtaata aatagacacc cctccacac cctctttccc caacctctgtg 60
ttgttcggag cgcacacaca cacaaccaga tctcccccac atccaccctg cggcacctcc 120
gcttcaaggt acgcccctcg tctccccccc cctctctctac cttctctaga tcggcggtcc 180
ggctccatggt tagggcccgg tagttctact tctgttcatg tttgtgttag atccgtgttt 240
gtgttagatc cgtgtgcta gcgttcgtac acggatgcga cctgtacgtc agacacgttc 300
tgattgctaa cttgccagtg tttctctttg ggaatcctg ggatggctct agccgttccg 360
cagacgggat cgatttcatg attttttttg tttcgttgca tagggtttg tttgcccttt 420
tcttttattt caatatatgc cgtgcacttg tttgtcgggt catcttttca tgcttttttt 480
tgtcttggtt gtgatgatgt ggtctgggtg ggcggctcgt ctgatcggga gtagaattct 540
gtttcaaact acctgggga tttattaatt ttggatctgt atgtgtgtgc catacatatt 600
catagttacg aattgaagat gatggatgga aatatcgatc taggataggt atacatgttg 660
atgcgggttt tactgatgca tatacagaga tgctttgtt cgcttggttg tgatgatgtg 720
gtgtgggttg gcggtcgttc attcgttcta gatcggagta gaatactgtt tcaaactacc 780
tgggtgattt attaatattg gaactgtatg tgtgtgtcat acatcttcat agttacgagt 840
ttaagatgga tggaaatate gatctaggat aggtatacat gttgatgtgg gttttactga 900
tgcataataca tgatggcata tgcagcatct attcatatgc tctaaccttg agtacctacc 960
tattataata aacaagtatg ttttataatt attttgatct tgataactt ggatgatggc 1020
atatgcagca gctatatgtg gattttttta gcctgcctt catacgtat ttatttgctt 1080
ggtaactgttt cttttgtcga tgctcaccct gttgtttggt gttactctcg caggteagat 1140
ggccaccatg g 1151

```

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Promotor que comprende una secuencia de nucleótidos según SEC. ID. N° 1 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos según SEC. ID. N° 1 o una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones astringentes con la secuencia de nucleótidos según SEC. ID. N° 1 o una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos según SEC. ID. N° 1, presentando el promotor una actividad específica del tejido y siendo más activo en las células del parénquima xilemático de las raíces de la planta que en otras células de la planta.
- 10 2. Versiones acortadas o alargadas o idénticas sección por sección u homólogos con al menos un 70% de homología a nivel de ADN de un promotor según la reivindicación 1, que presentan una actividad específica del tejido y son más activas en las células del parénquima xilemático de las raíces de la planta que en otras células de la planta.
- 15 3. Vector o elemento genético móvil que contiene un promotor según la reivindicación 1 o versiones acortadas o alargadas o idénticas sección por sección u homólogos con al menos un 70% de homología a nivel de ADN de un promotor según la reivindicación 2.
- 20 4. Célula huésped eucariótica o procariótica que se transforma con un promotor según la reivindicación 1 o versiones acortadas o alargadas o idénticas sección por sección u homólogos con al menos un 70% de homología a nivel de ADN de un promotor según la reivindicación 2.
- 5 5. Planta transgénica o partes de la misma que se transforman con un promotor según la reivindicación 1 o versiones acortadas o alargadas o idénticas sección por sección u homólogos con al menos un 70% de homología a nivel de ADN de un promotor según la reivindicación 2.
- 6 6. Planta transgénica según la reivindicación 5, **caracterizada porque** la planta es *Beta vulgaris*.
- 7 7. Semillas transgénicas de plantas según la reivindicación 5 o 6, transformándose las plantas con un promotor según la reivindicación 1 o versiones acortadas o alargadas o idénticas sección por sección u homólogos con al menos un 70% de homología a nivel de ADN de un promotor según la reivindicación 2.
- 25 8. Uso de un promotor según la reivindicación 1 o de versiones acortadas o alargadas o idénticas sección por sección u homólogos con al menos un 70% de homología a nivel de ADN de un promotor según la reivindicación 2 para la preparación de una planta transgénica con una o varias de las propiedades siguientes:
 - a. Procesos mejorados de carga y descarga del xilema en la raíz
 - b. Abastecimiento mejorado de nitrógeno
 - 30 c. Acumulación reducida de "nitrógeno dañino" en la raíz
 - d. Resistencia mejorada a la sal
 - e. Resistencia mejorada al estrés por sequedad
 - f. Tolerancia mejorada al hielo
 - g. Concentración Na⁺/K⁺ modificada en la raíz
 - 35 h. Aumento de la resistencia/tolerancia frente a patógenos

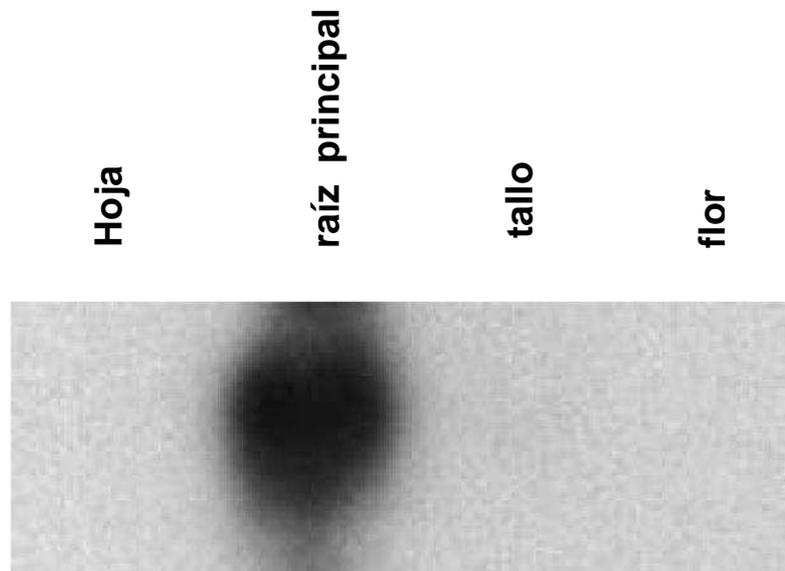


Figura 1

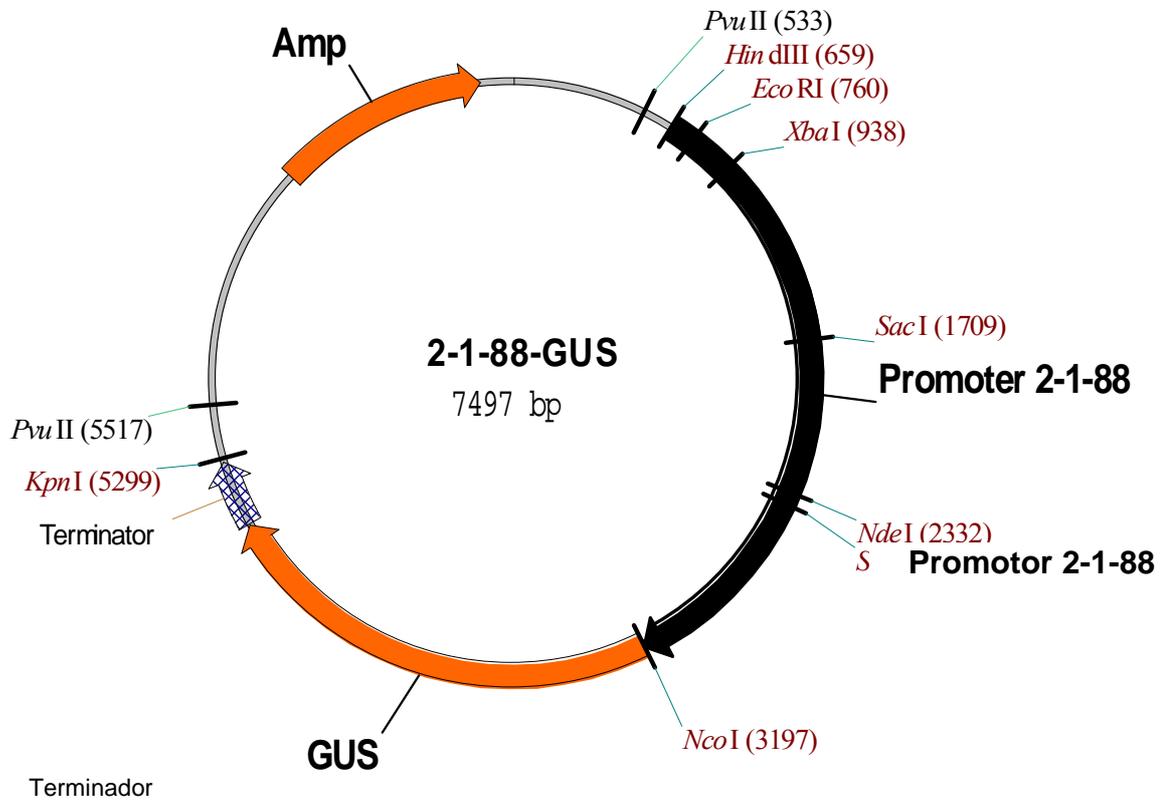


Figura 2

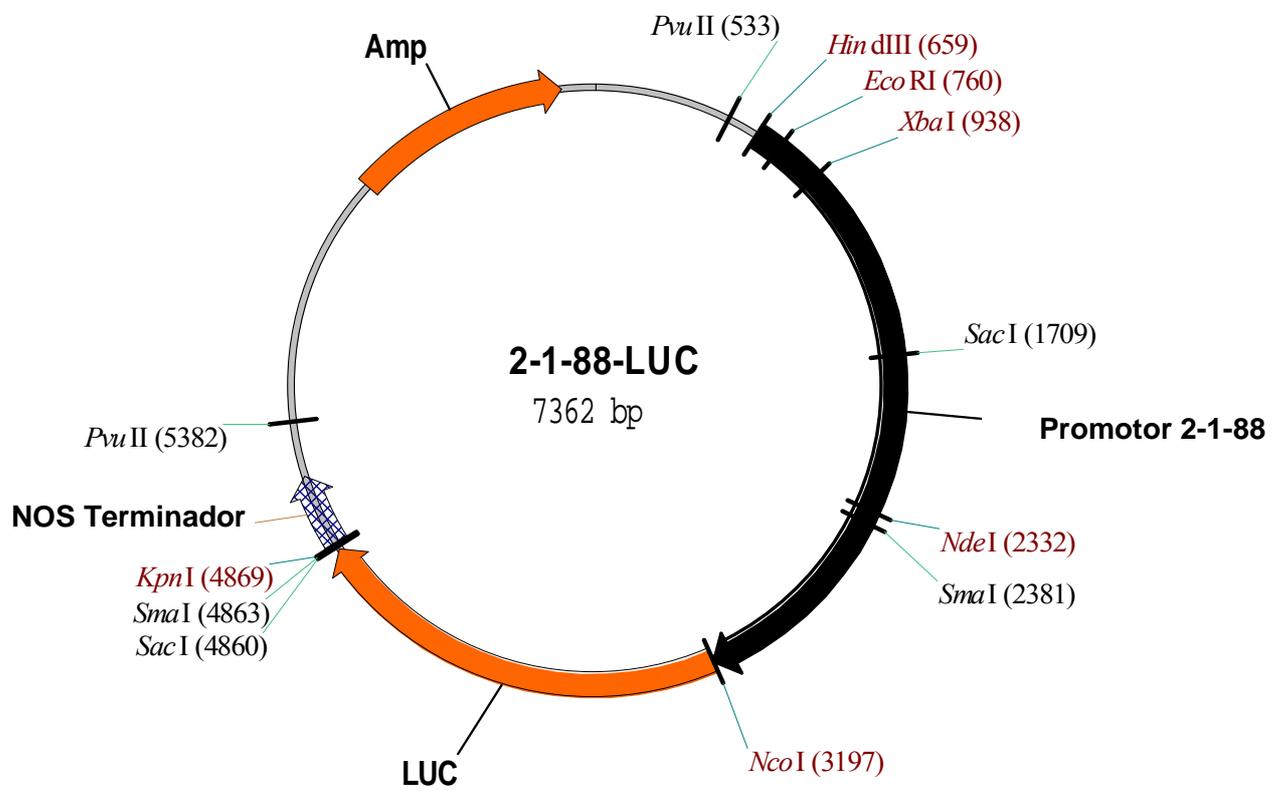


Figura 3

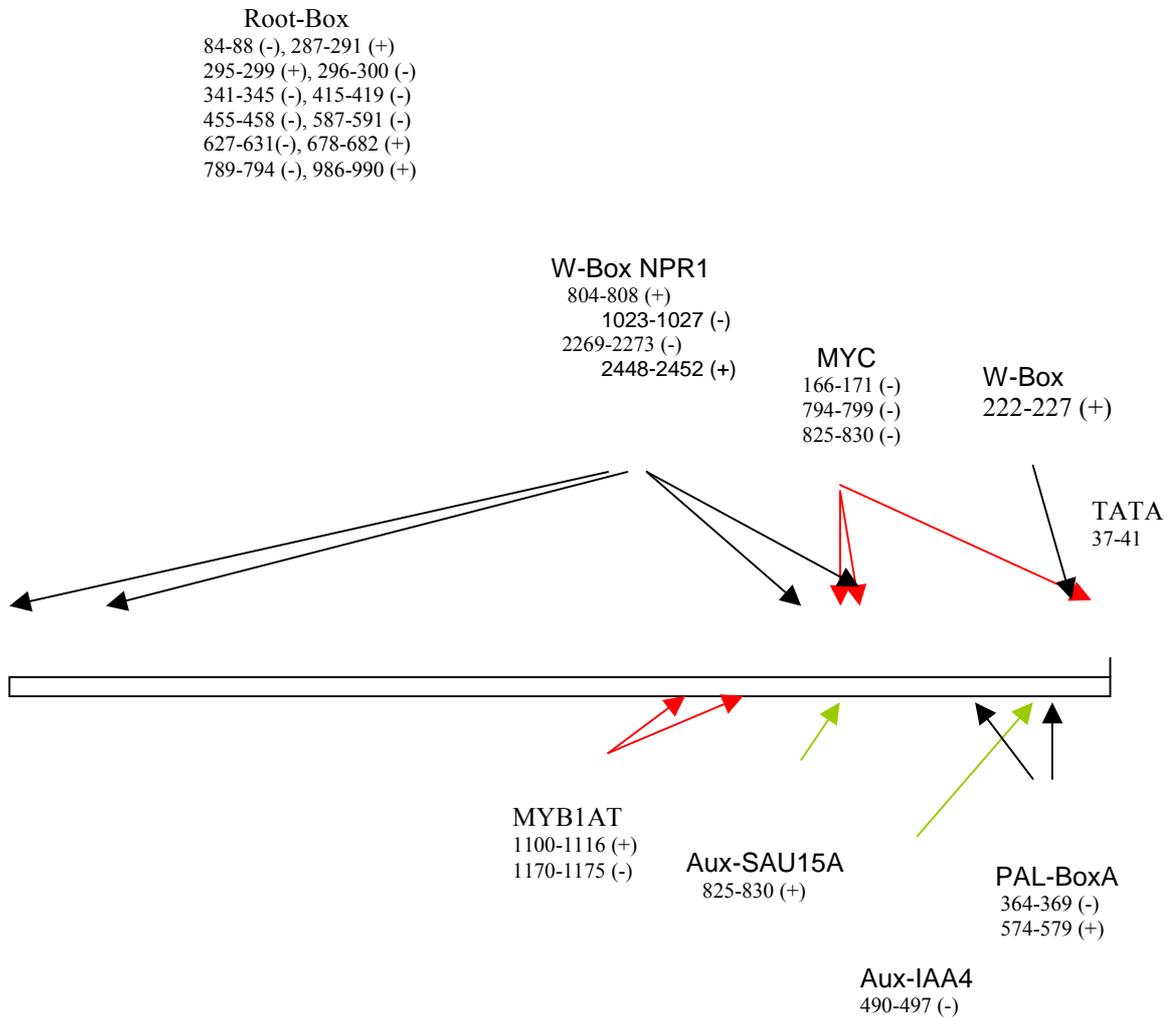


Figura 4

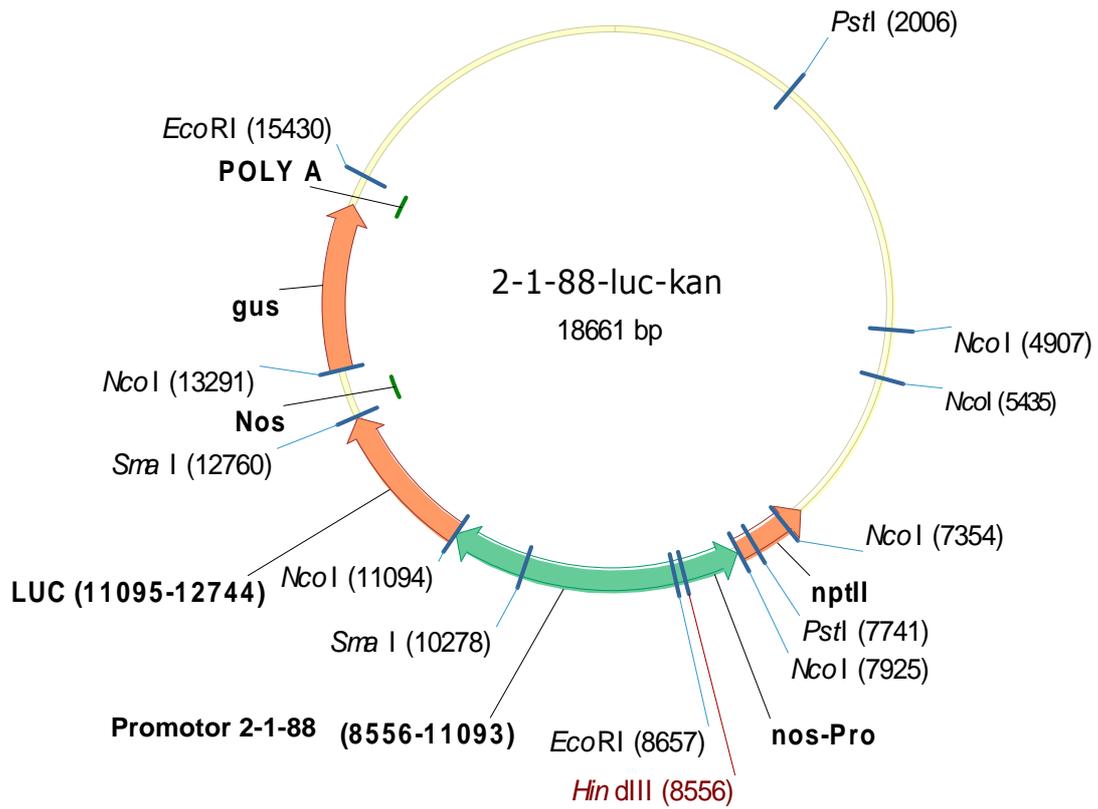


Figura 5

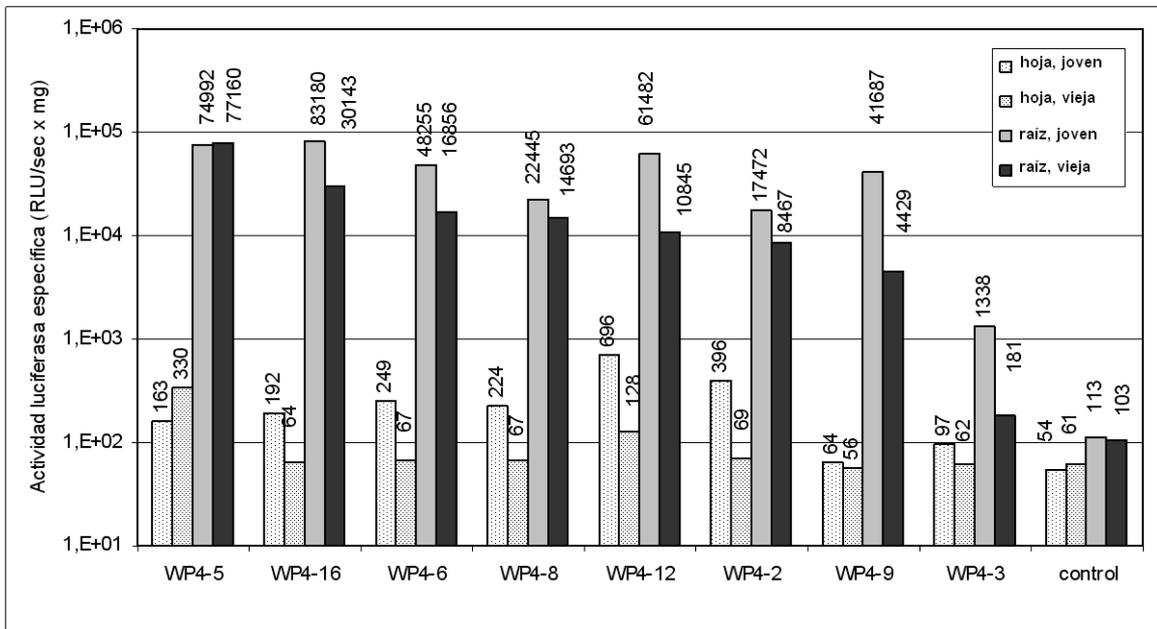


Figura 6

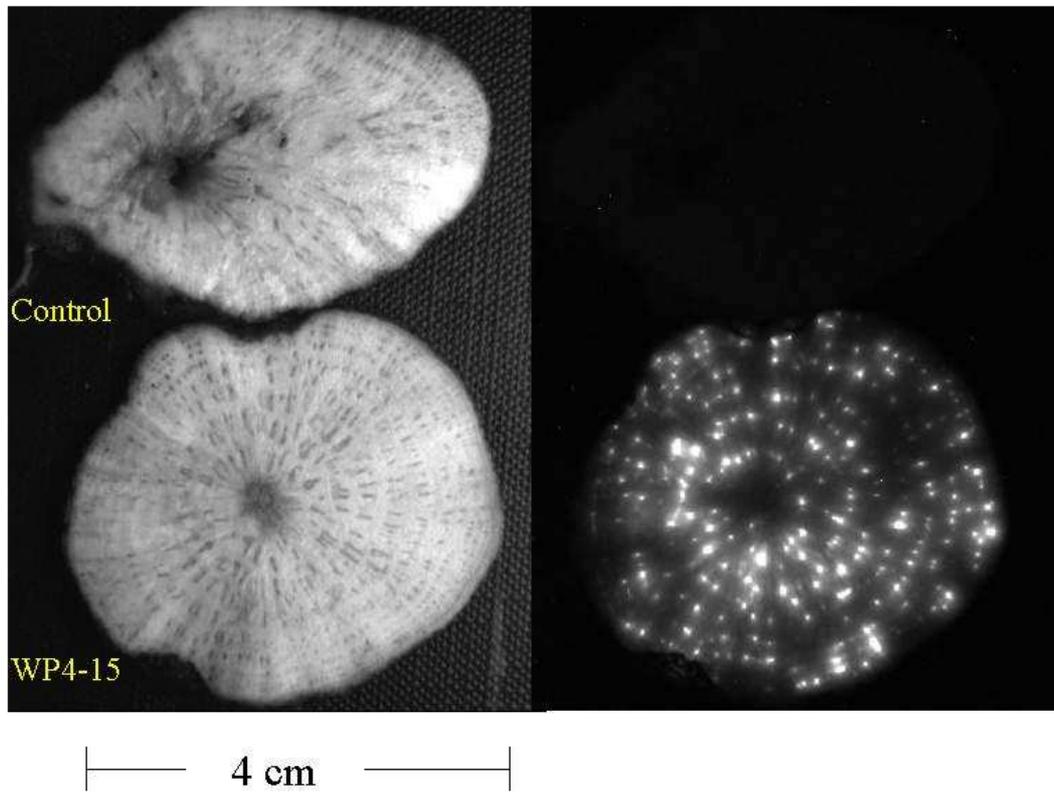
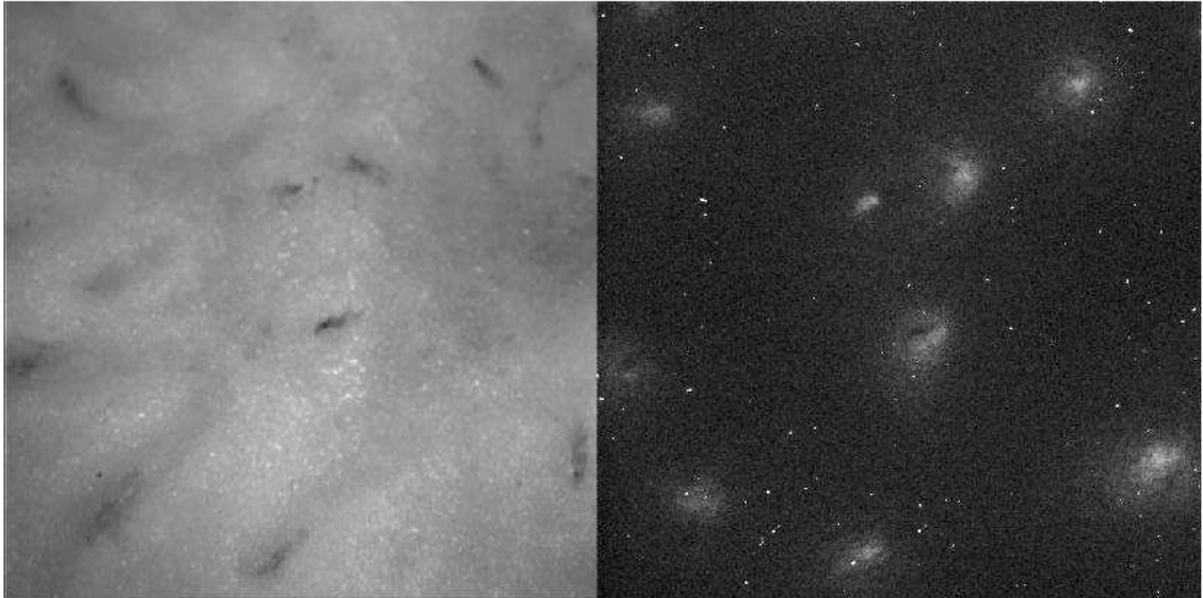
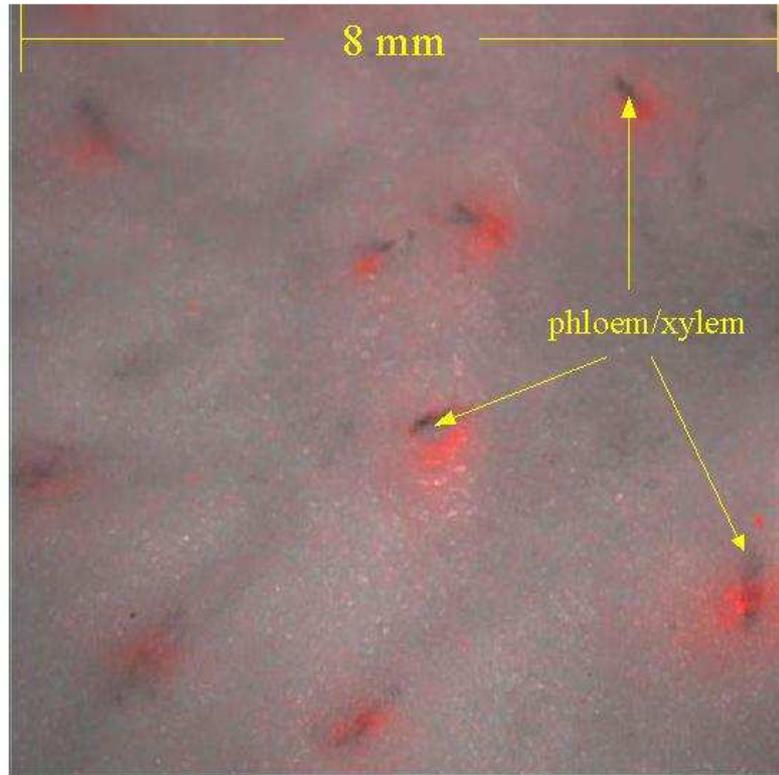


Figura 7



|----- 8 mm -----|

Figura 8



floema/xilema

Figura 9

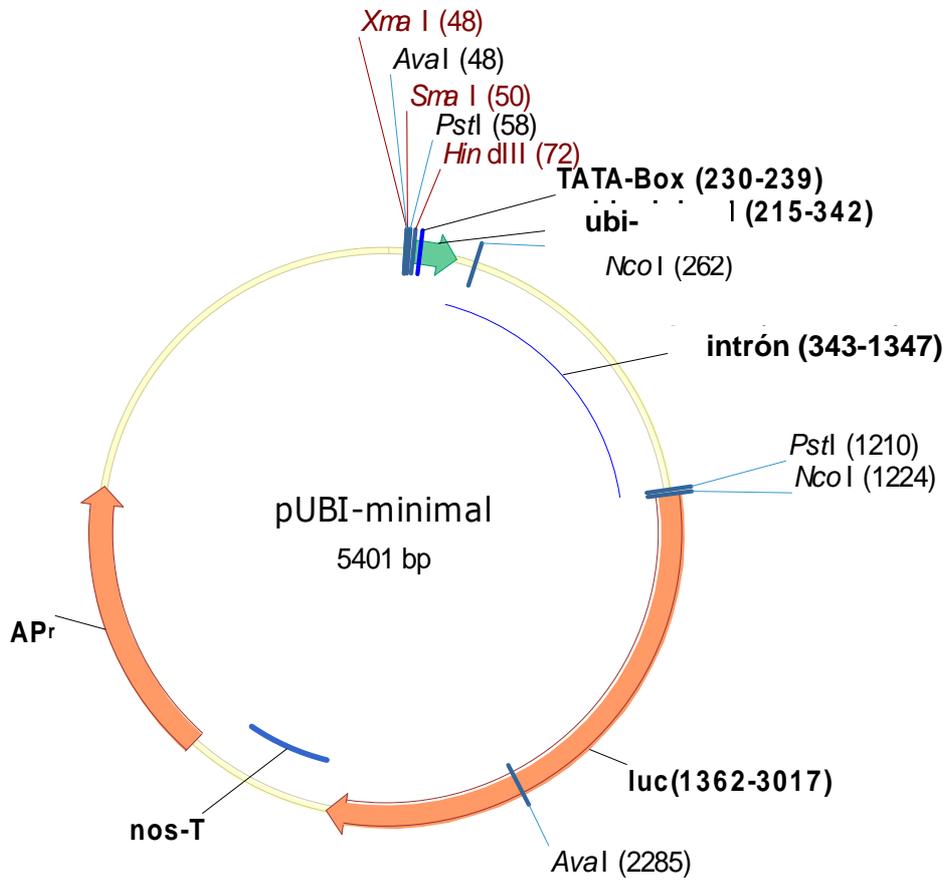


Figura 10