(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 390 180**

(51) Int. CI.:

C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **07764382 .3**
(96) Fecha de presentación: **16.06.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2035563**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **18.03.2009**

(54) Título: **Promotor sintético inducible para patógenos**

(30) Prioridad:
22.06.2006 DE 102006029129

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.11.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.11.2012

(73) Titular/es:
KWS SAAT AG (100.0%)
GRIMSEHLSTRASSE 31
37555 EINBECK, DE

(72) Inventor/es:
SCHMIDT, KLAUS

(74) Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

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 sintético inducible por patógenos

La presente invención se refiere a un promotor sintético inducible por patógenos, que es apropiado para la regulación de la transcripción de un ácido nucleico y comprende un promotor mínimo. Además, la presente invención se refiere a una célula vegetal transgénica, así como a plantas transgénicas.

Se conocen diferentes procedimientos para la obtención de plantas resistentes contra patógenos como hongos, virus, bacterias y nematodos. Algunos de estos procedimientos emplean la reacción de hipersensibilidad (RH) de la planta, produciéndose la formación de necrosis en los puntos de contacto directo entre patógeno y planta. A consecuencia de la RH, en las células vecinas se inicia un amplio espectro de medidas de defensa contra patógenos, las cuales impiden que continúe el avance del patógeno en el tejido vegetal.

La RH se puede producir tras la expresión de genes efectores, como por ejemplo genes de avirulencia de un patógeno y la interacción con el producto de un gen de resistencia correspondiente (gen R). Así, el gen R puede existir en la planta o se puede insertar en el correspondiente genoma vegetal mediante métodos de ingeniería genética (Stuiver y col. 1998, Keller y col., 1999, Belbahri y col., 2001). Además, una sobreexpresión o autoactivación de los genes R puede conducir a la activación de una RH (Tao y col., 2000, Tang y col., 1999, Bendahmane y col., 2002, Howles y col., 2005). Mediante la sobreexpresión de un gen R se sobrepasa un valor límite que conduce a la activación de una cascada de señales que normalmente sólo se desencadena por la presencia del patógeno o sus productos del gen de avirulencia. Mediante la activación de esta cascada se puede obtener una resistencia de amplia eficacia contra patógenos (Oldroyd y Staskawicz, 1998, Tang y col., 1999, Tao y col., 2000, Howles y col., 2005). Como genes R autoactivos se describen aquellos genes R que se modificaron hasta el punto que para la activación de nuevo de la cascada de señales no es necesaria la presencia del patógeno/producto del gen de avirulencia y al mismo tiempo es suficiente una cantidad de expresión reducida en comparación con la forma no modificada, para conseguir la activación de la cascada de señales.

Stuiver y col. (1998) pudo mostrar que la transformación del gen avr9 del hongo fitopatógeno *Cladosporium fulvum* bajo el control del promotor Gst1 inducible por patógenos procedente de la patata en plantas de tomate que llevan el gen Cf9 correspondiente condujo a una resistencia a los hongos de amplia eficacia. Se pudo obtener una resistencia contra los oomicetos *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* en *Nicotiana tabacum*, después se transformó el eleicitor criptogeína de *P. cryptogea* o el elicitor bacteriano popA de la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* en *N. tabacum*. Ambos genes estuvieron bajo el control del promotor inducible por patógenos hsr203J de *N. tabacum* (Keller y col., 1999, Belbahri y col., 2001).

El sistema de la activación de la RH requiere un control estricto de la expresión del gen efector en el lugar de la infección. En la expresión incontrolada, la expresión del gen efector provoca efectos negativos en el crecimiento de las plantas y por tanto en el rendimiento de los cultivos (Stuiver y Custers, 2001). No obstante, se puede realizar una expresión controlada mediante la selección de promotores adecuados inducibles por patógenos. Éstos no deberían permitir ninguna expresión o permitir sólo una expresión baja en condiciones sin ataque, aunque en caso de ataque inducen una expresión claramente mayor en el lugar de la infección. Tras la transformación de dos formas autoactivas diferentes del gen de resistencia a la roya L6 del lino (*Linum usitatissimum*) en lino bajo el control del promotor natural *Fis1* del lino inducible por roya se pudieron determinar dos fenotipos. Por un lado, las plantas de crecimiento normal que no mostraron ninguna resistencia mejorada contra patógenos, por otro lado las plantas de bajo crecimiento con amplia resistencia contra patógenos (Howles y col., 2005). Estos resultados muestran que según la forma empleada del gen R autoactivo se produce una actividad del promotor que se puede encontrar ya por encima del valor límite de inducción de la cascada de señales, mientras en las plantas fenotípicamente discretas la inducción del promotor *Fis1* no basta para conseguir el valor límite. Por tanto, la especificidad del promotor *Fis1* natural no es suficiente para conseguir una resistencia de amplia eficacia frente a patógenos sin efectos negativos en el crecimiento de la planta.

Los promotores naturales inducibles por patógenos muestran a menudo una actividad demasiado inespecífica y son activados por numerosos estímulos, de modo que su uso para la expresión de los genes efectores mencionados arriba no tiene sentido, ya que también se puede producir una activación RH bajo condiciones sin infección. Esta fuga de los promotores conduce a una afectación del crecimiento de la planta y por tanto a una reducción de la cosecha en plantas cultivadas. Por consiguiente, se han desarrollado promotores sintéticos que contienen motivos de secuencia (elementos cis-reguladores) procedentes de promotores naturales inducibles por patógenos que son relevantes para la inducción por patógenos. Por el contrario, se eliminan los motivos de secuencia para otros estímulos. Los elementos cis-reguladores se clonaron corriente arriba de un promotor mínimo, de modo que se consiguió un promotor funcional que presenta una elevada especificidad en comparación con los promotores naturales a partir de los cuales se aislaron los correspondientes elementos cis-reguladores (Rushton y col., 2002). Como promotor mínimo para plantas dicotiledóneas se empleó el intervalo -46 a +8 del gen 35S del *virus del mosaico de la coliflor*. Además, se conoce el uso de un promotor mínimo a partir de un promotor natural, del que se clonó el correspondiente elemento cis-regulador (Perl-Treves y col., 2004). Para plantas monocotiledóneas se describe el uso del promotor mínimo del gen Act1 del arroz (Lü y col., 2000).

Aunque los promotores sintéticos descritos son superiores a los promotores naturales, siguen mostrando actividad de fondo, incluso en condiciones sin ataque. Esta actividad de fondo fluctúa entre tipos de plantas individuales. Así, en todos los tipos de plantas estudiados hasta ahora se ha podido constatar inducibilidad por patógenos, aunque fluctúan las intensidades de la inducción y la actividad absoluta de los promotores. Así, debido a una actividad de fondo demasiado intensa en tejidos no infectados sólo se puede determinar una baja inducibilidad por patógenos como cociente de la actividad del promotor en el tejido infectado dividido por la actividad del promotor en el tejido no infectado.

Hasta ahora sólo se ha hecho responsables de la cantidad de actividad de fondo de un promotor sintético a los elementos cis-reguladores usados. Éstos tienen una influencia muy grande en la fuerza del promotor (Rushton y col., 2002). La influencia del promotor mínimo se ha estudiado poco hasta ahora. Según los datos bibliográficos el promotor mínimo tiene muy poca influencia en la regulación de la actividad del promotor (Singh, 1998). Sin embargo, Bhullar y col. (2003) pudieron observar una clara reducción de la actividad promotora del promotor 35S cuando se intercambió el promotor mínimo (-46 bis +1) por promotores mínimos vegetales heterólogos. Estas diferencias se atribuyeron a secuencias diferentes de la caja TATA, mientras en su opinión las regiones que flanquean la caja TATA del promotor mínimo no fueron relevantes para la actividad del promotor.

Por tanto, es objeto de la presente invención proporcionar un promotor sintético inducible por patógenos con baja actividad de fondo.

Según la invención el objetivo propuesto se alcanza mediante un promotor sintético inducible por patógenos con un promotor mínimo, presentando el promotor mínimo un motivo de secuencia dbrmwa que está dispuesto corriente abajo de una región TATA y antes de un punto de inicio de transcripción situado sobre el promotor mínimo, en el que empieza la transcripción del ácido nucleico que se tiene que regular y en el que el promotor sintético inducible por patógenos presenta junto al promotor mínimo al menos un elemento cis-regulador con una secuencia de nucleótidos según una de las SEC. ID. Nº: 10 – 15.

Los símbolos de los motivos de secuencia tienen el significado siguiente:

d = nucleótido a o g o t/u
b = nucleótido c o g o t/u
r = nucleótido g o a
m = nucleótido a o c
w = nucleótido a o t/u
a = nucleótido a
t = nucleótido t
c = nucleótido c

En el sentido de esta invención, un “promotor mínimo” de una secuencia de ADN es un promotor necesario para la función promotora. A esta secuencia de ADN se le pueden unir factores de transcripción generales, como p. ej. TFII-D, TFII-A, TFII-B, TFII-E y TFII-F, y formar la plataforma para la unión del complejo ARN-polimerasa II/TFII-F. Como la transcripción del ADN en el ARNm empieza en esta zona, el punto de inicio de la transcripción (TS) se encuentra dentro del promotor mínimo y se fija como posición +1. El promotor mínimo comprende el TS y puede alcanzar, por ejemplo, de la posición -50 a la posición +15. Alrededor de la posición -30 a menudo se encuentra la llamada caja TATA, aunque no aparece en todos los promotores. La caja TATA es una región donde se suceden bases timina y adenina. La caja TATA es el sitio de unión para la proteína (TBP) de unión a la caja TATA.

Como “promotores sintéticos” se designan aquellos promotores que no se encuentran en la naturaleza, que están compuestos a partir de varios elementos y contienen un promotor mínimo, presentando asimismo corriente arriba del promotor mínimo al menos un elemento cis-regulador, el cual sirve de sitio de unión para factores de transcripción especiales. Los promotores sintéticos se conciben según los requerimientos deseados y se inducen o reprimen mediante diferentes factores.

Los “derivados” de un promotor son versiones de este promotor acortadas o alargadas o idénticas sección por sección u homólogos con propiedades iguales, modificadas o singulares.

A este respecto, la expresión “homología” representa una homología de al menos el 70% de los niveles de ADN, la cual se puede determinar según procedimientos conocidos, por ejemplo la comparación de secuencias computerizada (Altschul, S.F. y col., 1990).

El promotor sintético inducible por patógenos según la invención, tras transformación biolística transitoria en tejidos de hojas de las plantas correspondientes conduce a una actividad de base reducida en comparación con los promotores empleados normalmente con un promotor mínimo como el promotor mínimo 35S en plantas dicotiledóneas y el promotor mínimo ubi1 del maíz en plantas monocotiledóneas. Además, se encontró que en los promotores sintéticos inducibles por patógenos según la invención también aumenta la velocidad de inducción.

Por tanto, los promotores sintéticos inducibles por patógenos según la invención se pueden emplear para la obtención de plantas transgénicas que poseen una amplia resistencia contra numerosos patógenos, como hongos, oomicetos, bacterias, virus, insectos y nematodos.

El motivo de secuencia dbrmwa se encuentra en orientación sentido en la hebra codogénica entre la caja TATA y el punto de inicio de la transcripción y también puede presentarse dos o más veces. Las secuencias preferidas para los promotores mínimos se indican en las SEC. ID. Nº 1 a 7.

Los elementos cis-reguladores para la preparación de promotores sintéticos inducibles por patógenos son sobre todo aquellos elementos presentes en los promotores naturales inducibles por patógenos y que allí son responsables de la inducción por patógenos. Su identificación se describe en Rushton y col. (2002).

Los elementos cis-reguladores preferidos para la preparación de promotores sintéticos mediante el uso de los promotores mínimos según la invención se describen también en el documento WO 00/29592. De los elementos cis-reguladores mencionados allí es adecuada sobre todo la caja D (SEC. ID. Nº 10), en particular en la combinación 2xS/2xD (SEC. ID. Nº 11), así como el elemento Gst1, en particular en la combinación 4xGst1 (SEC. ID. Nº 12).

Entre las combinaciones ventajosas de elementos cis se cuentan las combinaciones generales de la caja D (SEC. ID. Nº 10) con la caja S o el elemento Gst1. Son particularmente ventajosas, además de la combinación mencionada anteriormente 2xS/2xD (SEC. ID. Nº 11), las combinaciones 2xS/4xD (SEC. ID. Nº 13); 4xS/2xD (SEC. ID. Nº 14) y 2xGst1/2xD (SEC. ID. Nº 15). La combinación del elemento 2xS/4xD (SEC. ID. Nº 13) con el promotor mínimo según SEC. ID. Nº 2 mostró en patatas transgénicas tras la infección con *Phytophthora infestans* un aumento promedio de la actividad del gen reportero en un factor de 253.000 comparado con el control no infectado. Cuando el elemento 4xS/2xD (SEC. ID. Nº 14) se clonó antes del promotor mínimo (SEC. ID. Nº 2) se pudo detectar un incremento promedio de la actividad del gen reportero en un factor de 2.892. En el elemento 2xGst1/2xD (SEC. ID. Nº 15) se consiguió un incremento medio en un factor de 2.967 en comparación con el control.

Por lo tanto, con los promotores según la invención se prepararon células vegetales transgénicas que se pudieron regenerar en plantas completas con propiedades defensivas mejoradas contra patógenos. Asimismo, las semillas de dichas plantas transgénicas contienen los promotores según la invención. Esta invención no está limitada a determinados tipos de plantas.

Por tanto, el nuevo promotor se puede emplear también para la obtención de una planta resistente contra patógenos, en la cual en una célula vegetal se introdujo un gen apropiado para la producción de una defensa contra patógenos, el cual se encuentra bajo el control de un promotor sintético inducible por patógenos y a continuación a partir de esta célula vegetal se regenera una planta, caracterizada porque el promotor sintético inducible por patógenos es un promotor sintético inducible por patógenos como el descrito anteriormente.

Ejemplos

La Figura 1 muestra una comparación de secuencias entre los promotores mínimos preferidos para plantas dicotiledóneas (SEC. ID. Nº 1 a 7) con las regiones TATA conservadas y los motivos dbrmwa, así como los sitios de corte PstI y XhoI empleados para la clonación en el plásmido pMS23luc+.

La Figura 2 muestra una comparación de secuencias entre los promotores mínimos preferidos para plantas monocotiledóneas (SEC. ID. Nº 8 y 9), que se emplearon para la transformación transitoria de hojas de trigo. Junto a la región TATA se representa el motivo de secuencia twcccmt como región conservada.

Se pudo mostrar que los promotores mínimos StGst (SEC. ID. Nº 6), NtTGAA (SEC. ID. Nº 5), StPSBR (SEC. ID. Nº 7), NpCABE (SEC. ID. Nº 2), NtRBS (SEC. ID. Nº 3), NpATP2 (SEC. ID. Nº 1) y Nt5EAS (SEC. ID. Nº 4) presentan una actividad claramente reducida (< 70%) en comparación con el promotor mínimo 35S.

La Figura 3 muestra un resumen de las actividades promedio del gen reportero de plantas de patata transgénicas no infectadas con un promotor sintético compuesto por el elemento 4xGst1 (SEC. ID. Nº 12) y los promotores mínimos indicados, clonado antes del gen Luciferasa de *Photinus pyralis* como gen reportero (RLU = unidades de luz relativas). Líneas transgénicas estables con los promotores mínimos que llevan el motivo de secuencia dbrmwa mostraron bajo condiciones control una expresión claramente reducida del gen reportero en comparación con el promotor mínimo 35S. La actividad promedio más baja se alcanzó usando el promotor mínimo del gen NpATP2 (SEC. ID. Nº 1). En estas plantas se pudo medir sólo el 9,7 % de la actividad promedio del promotor mínimo 35S. Empleando los promotores mínimos StPSBR (SEC. ID. Nº 7), NtTGAA (SEC. ID. Nº 5) o StGst (SEC. ID. Nº 6) se midió un 18% de la actividad del promotor mínimo 35S, en el promotor mínimo NtRBS (SEC. ID. Nº 3) un 26%, en el promotor mínimo NpCABE (SEC. ID. Nº 2) un 39% y en el promotor mínimo Nt5EAS (SEC. ID. Nº 4) un 41%.

No es ningún problema para el especialista la obtención de construcciones apropiadas para la transformación de plantas con los promotores según la invención. Así, por ejemplo, se puede preparar el vector binario p4xGst1-luc-

kan (Figura 8), que se emplea para la transformación estable de plantas de patata de la variedad "Baltica". Este vector es un derivado del vector binario pGPTV (Becker y col., 1992). El vector binario p4xGst1luc-kan lleva el gen Luciferasa de *Photinus pyralis* bajo el control del promotor sintético 4xGst1:35S promotor mínimo (Rushton y col., 2002). El plásmido contiene como secuencia de terminación el terminador del gen de la nopalin sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*. El casete de expresión descrito se localiza en el T-ADN junto con un casete de expresión funcional para el gen de la neomicin fosfotransferasa (nptII) como marcador de selección. La neomicin fosfotransferasa confiere a las plantas transgénica resistencia contra la kanamicina o la paromicina. Para intercambiar el promotor mínimo 35S por los promotores mínimos descritos anteriormente se digirió el vector binario p4xGst1luc-kan con XhoI/SalI, de modo que se eliminó el promotor mínimo 35S, permaneciendo sin embargo el tetrámero del elemento Gst1. El punto de corte SalI se rellenó con ayuda del enzima polimerasa de Klenow y dNTP, para conseguir un extremo romo. Los promotores mínimos, clonados en el plásmido pMS23luc+, se cortaron mediante digestión con PdiI/XhoI, se ligaron en el vector binario y a continuación se transformaron en *E. coli*. Los vectores binarios con la nueva secuencia se transformaron (An, 1987) en la cepa de agrobacterias GV3101::pMP90 (Koncz y Schell, 1986) y se seleccionaron usando el antibiótico kanamicina (50 mg/l). Las agrobacterias transgénicas se emplearon para la transformación de patatas de la variedad "Baltica" (Dietze y col., 1995).

La figura 4 muestra un resumen de las inducciones obtenidas tras la infección *in vitro* de plantas de patata transgénicas estables con un promotor sintético compuesto por el elemento 4xGst1 (SEC. ID. Nº 12) y los promotores mínimos indicados. La infección se produjo en plantas *in vitro* con una suspensión de zoosporas de *Phytophthora infestans*.

A diferentes instantes de tiempo tras la inoculación se tomaron muestras de hojas de plantas *in vitro*, se determinó el peso de las muestras y se añadieron 10 volúmenes de tampón 1xCCLR (Promega, Mannheim). El material se homogeneizó en el tampón sobre hielo con ayuda de un homogeneizador RW20 (IKA Labortechnik, Staufen). Mediante centrifugación a >10.000 x g durante 10 minutos se decantó el homogeneizado y 10 µl del sobrenadante se mezclaron con 50 µl de sustrato LAR (Promega, Mannheim) en un tubito luminométrico y se determinó la emisión de luz como medida de la actividad de la Luciferasa en un luminómetro (Sirius, Berthold Detection System GmbH, Pforzheim). Como comparación se emplearon plantas *in vitro* que habían crecido bajo las mismas condiciones y en lugar de zoosporas se trataron simulando con agua. El valor medio de los cocientes de cinco líneas independientes de la actividad Luciferasa en las variantes infectadas respecto a las simuladas indica la inducción del promotor sintético debido a la infección. Como se observa en la Fig. 7, mediante el uso del promotor mínimo 35S sólo se pudo obtener una inducción máxima de la actividad Luciferasa en un factor de diez 72 h tras la infección. Por el contrario, todos los promotores mínimos nuevos mostraron una inducción claramente mejorada. La inducción más fuerte tras la infección con un factor de 395 se consiguió 72 hpi con el promotor mínimo StPSBR (SEC. ID. Nº 7). En general se pudo mejorar la inducción mediante el uso de los nuevos promotores mínimos en el instante 72 hpi desde el factor de 3,5 para el promotor mínimo StGst (SEC. ID. Nº 6) hasta el factor de 39,5 para el promotor mínimo StPSBR (SEC. ID. Nº 7) en comparación con el promotor mínimo 35S. Resulta interesante que entre los promotores mínimos hay claras diferencias en la cinética de inducción tras la inoculación del patógeno. Usando el promotor mínimo 35S se puede medir la inducción más clara 72 hpi, produciéndose esto también al usar los promotores mínimos StPSBR, NtTGAA, StGst, NtRBS y NpATP2. Por el contrario, en los promotores NpCABE y Nt5EAS ya se puede detectar una fuerte activación en el instante 9 hpi y la inducción perdura el resto del tiempo de ensayo casi al nivel alcanzado.

La excelencia de los nuevos promotores mínimos se mostró también tras la fusión con la combinación de elementos cis 2xS/2xD. Para ello se transformaron de forma estable plantas de patata con los vectores binarios p2xS/2xDluc-kan, p2xS/2xDNpCABEluc-kan y p2xS/2xDNtTGAAluc-kan. Los vectores binarios se construyeron de manera que el elemento 4xGst1 de los vectores binarios arriba descritos con los nuevos promotores mínimos y el elemento 4xGst1 se eliminaron mediante digestión con BcuI/Eco147I y el elemento 2xS/2xD (SEC. ID. Nº 11) se introdujo como fragmento BcuI/Eco32I. Los vectores binarios con la nueva secuencia se transformaron (An, 1987) en la cepa de agrobacterias GV3101::pMP90 (Koncz y Schell, 1986) y se seleccionaron mediante el uso del antibiótico kanamicina (50 mg/l). Las agrobacterias transgénicas se emplearon para la transformación de patatas de la variedad "Baltica" (Dietze y col., 1995). Los brotes transgénicos se multiplicaron y se inocularon bajo condiciones *in vitro* con una suspensión de zoosporas (50.000 esporas/ ml) de *Phytophthora infestans*. Se pudo mostrar que usando el elemento cis-regulador 2xS/2xD (SEC. ID. Nº 11) también se podía conseguir una actividad de fondo reducida con los promotores mínimos según la invención en comparación con el promotor mínimo 35S (Fig. 5). Al mismo tiempo se pudo observar una inducción más fuerte de los promotores sintéticos tras la inoculación de patatas transgénicas con *P. infestans* (Fig. 6). La intensificación de la inducción no se acentuó tan claramente en el punto final (3 días tras la infección = 3 dpi) como se pudo observar usando el elemento 4xGst1. Sin embargo, 2 días tras la infección se pudo determinar una inducción claramente más fuerte tras el ataque de patógenos mediante el uso de los nuevos promotores mínimos. Por consiguiente, el uso de estos promotores mínimos tiene como consecuencia una mejora de la cinética de los promotores sintéticos, de modo que la reacción al ataque de patógenos se produce antes, en comparación con los promotores sintéticos mediante el uso del promotor mínimo 35S.

La Figura 7 muestra la comparación de la actividad normalizada de promotores sintéticos inducibles por patógenos compuestos por el elemento 2xS/2xD (SEC. ID. Nº 11) y los promotores mínimos ubi1 (promotor de comparación), TaPAL (SEC. ID. Nº 9) y TaACS (SEC. ID. Nº 8) tras transformación biolística en hojas primarias de la variedad de maíz "Taifun". Como se puede reconocer, los nuevos promotores mínimos TaPAL y TaACS en maíz tienen una

reducida actividad de fondo en comparación con el promotor mínimo ubi1. Mientras con el promotor mínimo ubi1 se pudo medir una actividad normalizada de 0,17, mediante el uso del promotor mínimo TaPAL ésta se pudo reducir a 0,072 y mediante el uso del promotor mínimo TaACS a 0,13.

La Figura 9 muestra el plásmido pubiTATARucII, que contiene un ADNc con los genes Luciferasa de *Renilla reniformis*, como se encuentra en el plásmido comercial pRL-Null. El ADNc se encuentra bajo el control del promotor mínimo ubi1. El promotor mínimo ubi1 comprende las regiones de secuencia de -45 a +76 relativas al punto de inicio de la transcripción. Para aumentar la intensidad de la expresión el primer intrón del gen ubi1 está contenido en su contexto natural en el plásmido antes del gen reportero. El plásmido sirvió para la clonación del elemento cis-regulador 2xS/2xD (SEC. ID. Nº 11), para de este modo obtener un promotor sintético inducible por patógenos. El promotor mínimo ubi1 se intercambió por los nuevos promotores mínimos para mejorar las propiedades de los promotores sintéticos.

Referencias

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

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

Becker, D. y col. (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. Plant Mol Biol. 29: 1195-1197

Belbahri, L. y col. (2001). A local accumulation of the Ralstonia solanacearum PopA protein in transgenic tobacco renders a compatible plant-pathogen interaction incompatible. Plant J. 28: 419-430

Bendahmane, A. y col. (2002). Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. Plant J. 32: 195-204

Bhullar, S. (2003). Strategies for the development of functionally equivalent promoters with minimum sequence homology for transgene expression in plants: cis-elements in a novel DNA context versus domain swapping. Plant Physiol. 132: 988-998

Dietze, J. y col. (1995). Agrobacterium-mediated transformation of potato (Solanum tuberosum). In: Gene Transfer to Plants XXII (Potrykus, I. and Spangenberg, G., eds.). Berlin: Springer Verlag, pp 24-29

Howles, P. y col. (2005). Autoactive alleles of the flax L6 rust resistance gene induce non-race-specific rust resistance associated with the hypersensitive response. Mol. Plant-Microbe Interact. 18: 570-582

Keller, H. y col. (1999). Pathogen-induced elicitin production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and non-specific disease resistance. Plant Cell 11: 223-235

Koncz, C. and Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium vector. Mol. Gen. Genet. , 204: 383-396

Lü, H. y col. (2000). Construction of chimeric inducible promoters by elicitors of rice fungal blast pathogen and their expression in transgenic rice. Chinese Science Bulletin 45: 242-246

Oldroyd, G.E.D. and Staskawicz, B.J. (1998). Genetically engineered broad spectrum disease resistance in tomato. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95: 10300 – 10350

Maas, C. y col. (1991). The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunken-1 gene with the following intron1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold. Plant Mol Biol. 16: 199-207

Perl-Treves, R. y col. (2004). Early induction of the Arabidopsis GSTF8 Promoter by specific strains of the fungal pathogen Rhizactonia solani. Mol. Plant-Microbe Interact. 17: 70-80

Rushton, P.J. y col. (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signalling. Plant Cell 14, 749-762

Singh, K.B. (1998). Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. Plant Physiol. 118: 1111-1120

Stuiver, M. H. and Custers, J.H.H.V. (2001). Engineering disease resistance in plants. Nature 411: 865-868

Stuiver, M.H. y col. (1998). Infection-induced expression of the avirulence gene avr9 in transgenic Cf9 tomato plants confers resistance to fungal pathogen attack. 7th International congress of plant pathology, 9 – 16 August, Edinburgh, Scotland

Tang, X. y col. (1999). Overexpression of Pto activates defense responses and confers broad resistance. Plant Cell 11:15-29

Tao, Y. y col. (2000). Mutational analysis of the Arabidopsis nucleotide binding site-leucine-rich repeat resistance gene RPS2. Plant Cell 12: 2541-2554

PROTOCOLO DE SECUENCIA

<110> KWS SAAT AG
Schmidt, Klaus

<120> PROMOTOR MÍNIMO

<130> KWS 0111 PCT

<160> 15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 69
<212> ADN
<213> Nicotiana plumbaginifolia

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(8)
<223> Secuencia de reconocimiento PstI

<220>
<221> TATA_signal
<222> (19)..(24)

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(37)
<223> dbrmwa

<220>
<221> misc_feature
<222> (62)..(69)
<223> Secuencia de reconocimiento XhoI

<400> 1
aactgcagtg ggctcttgat atatcagctc ttcacaaacc ctagcagtct ctttctctcc 60

tctcgagtt 69

<210> 2
<211> 67
<212> ADN
<213> Nicotiana plumbaginifolia

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(8)
<223> Secuencia de reconocimiento PstI

<220>
<221> TATA_signal
<222> (19)..(24)

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(36)
<223> dbrmwa

<220>

<221> misc_feature
<222> (60)..(67)
<223> Secuencia de reconocimiento XhoI

<400> 2
aactgcagta aagccattta tatacactta gtgcaaagcc catgaaactc aagcctcaac 60

tcgagtt 67

<210> 3
<211> 67
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> Misc_feature
<222> (1)..(8)
<223> Secuencia de reconocimiento PstI

<220>
<221> TATA_signal
<222> (18)..(25)

<220>
<221> Misc_feature
<222> (33)..(38)
<223> dbrmwa

<220>
<221> Misc_feature
<222> (60)..(67)
<223> Secuencia de reconocimiento XhoI

<400> 3
aactgcagcc ttatcattat atatagggtg gtgggcaact atgcaatgac catattggac 60

tcgagtt 67

<210> 4
<211> 69
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(8)
<223> Secuencia de reconocimiento PstI

<220>
<221> TATA_signal
<222> (24)..(31)

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(43)
<223> dbrmwa

<220>
<221> misc_feature
<222> (62)..(69)
<223> Secuencia de reconocimiento XhoI

<400> 4
aactgcagca gtttaatgta cattacatat aggttgcgga aaagtatata tatgctcaag 60

actcgagtt 69

<210> 5
<211> 67
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(8)
<223> Secuencia de reconocimiento PstI

<220>
<221> TATA_signal
<222> (19)..(24)

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(36)
<223> dbrmwa

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)..(67)
<223> Secuencia de reconocimiento XhoI

<400> 5
aactgcagta aagccattta tatacactta gtgcaaagcc catgaaactc aagcctcaac 60

tcgagtt 67

<210> 6
<211> 67
<212> ADN
<213> Solanum tuberosum

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(8)
<223> Secuencia de reconocimiento PstI

<220>
<221> TATA_signal
<222> (24)..(30)

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(43)
<223> dbrmwa

<400> 6
aactgcagag tcaaatataa ttttatatta gaataattga atagtcaaac aagaaacttt 60

aacgagt 67

<210> 7
<211> 75
<212> ADN

<213> Solanum tuberosum

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(8)
<223> Secuencia de reconocimiento PstI

<220>
<221> TATA_signal
<222> (26)..(34)

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(41)
<223> dbrmwa

<220>
<221> misc_feature
<222> (68)..(75)
<223> Sitio de corte de restricción XhoI

<400> 7
aactgcagac catgcaaagt gaaaataaat aattcatact aagtagtgag agcaaagaag 60

aaaaaagctc gagtt 75

<210> 8
<211> 69
<212> ADN
<213> Triticum aestivum

<220>
<221> promotor
<222> (1)..(69)
<223> Promotor mínimo

<220>
<221> TATA_signal
<222> (13)..(20)

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(44)
<223> twcccmt

<400> 8
gcgccacgaa tctataaata ggcaccaacg agcagcttac ccattcatct ccctccctcc 60

ctccgccag 69

<210> 9
<211> 149
<212> ADN
<213> Triticum aestivum

<220>
<221> TATA_signal
<222> (17)..(23)

<220>
<221> misc_feature

<222> (42)..(48)
<223> twcccmt

<220>
<221> 5'UTR
<222> (51)..(149)

<400> 9
atctgcaggc gctgcctatt taatcccttc ccctccctcc attcccctcc aagaagagcc 60

acagcttcat ctgcagctac agctcctctt cgtcttcgac acacaagtat tttttcagga 120

caaagatcaa tccagataca catacacct 149

<210> 10
<211> 31
<212> ADN
<213> Petroselinum crispum

<220>
<221> amplificador
<222> (1)..(31)
<223> Caja D

<400> 10
tacaattcaa acattgttca aacaaggaac c 31

<210> 11
<211> 128
<212> ADN
<213> Petroselinum crispum

<220>
<221> amplificador
<222> (1)..(128)
<223> elemento amplificador sintético compuesto por un dímero de caja S y caja D

<220>
<221> amplificador
<222> (1)..(25)
<223> Caja S

<220>
<221> amplificador
<222> (31)..(55)
<223> Caja S

<220>
<221> amplificador
<222> (61)..(91)
<223> Caja D

<220>
<221> amplificador
<222> (98)..(128)
<223> Caja D

<400> 11
cagccaccaa acaggaccca gaattctagt cagccaccaa agaggaccca gaattctagt 60

tacaattcaa acattgttca aacaaggaac ctctagttac aattcaaaca ttgttcaaac 120

aaggaacc 128

<210> 12
<211> 118
<212> ADN
<213> Solanum tuberosum

<220>
<221> amplificador
<222> (1)..(118)
<223> elemento amplificador sintético compuesto por un tetrámero del elemento Gst1

<220>
<221> amplificador
<222> (1)..(25)
<223> Caja Gst1

<220>
<221> amplificador
<222> (32)..(56)
<223> Caja Gst1

<220>
<221> amplificador
<222> (63)..(87)
<223> Caja Gst1

<220>
<221> amplificador
<222> (94)..(118)
<223> Caja Gst1

<400> 12
ttctagccac cagatttgac caaactctag tttctagcca ccagatttga ccaaactcta 60

gtttctagcc accagatttg accaaactct agtttctagc caccagattt gaccaaac 118

<210> 13
<211> 202
<212> ADN
<213> sintético

<220>
<221> amplificador
<222> (1)..(202)
<223> elemento amplificador sintético compuesto por el dímero de Caja xS y el tetrámero de Caja D

<220>
<221> amplificador
<222> (1)..(25)
<223> Caja S

<220>
<221> amplificador
<222> (31)..(55)
<223> Caja S

<220>
<221> amplificador

<222> (61)..(91)
<223> Caja D

<220>
<221> amplificador
<222> (98)..(128)
<223> Caja D

<220>
<221> amplificador
<222> (135)..(165)
<223> Caja D

<220>
<221> amplificador
<222> (172)..(202)
<223> Caja D

<400> 13
cagccaccaa agaggaccca gaattctagt cagccaccaa agaggaccca gaattctagt 60

tacaattcaa acattgttca aacaaggaac ctctagttac aattcaaaca ttgttcaaac 120

aaggaacctc tagttacaat tcaaacattg ttcaaacaag gaacctctag ttacaattca 180

aacattgttc aaacaaggaa cc 202

<210> 14
<211> 188
<212> ADN
<213> sintético

<220>
<221> amplificador
<222> (1)..(188)

<220>
<221> amplificador
<222> (1)..(25)
<223> Caja S

<220>
<221> amplificador
<222> (31)..(55)
<223> Caja S

<220>
<221> amplificador
<222> (61)..(85)
<223> Caja S

<220>
<221> amplificador
<222> (91)..(115)
<223> Caja S

<220>
<221> amplificador
<222> (121)..(151)
<223> Caja D

<220>
<221> amplificador
<222> (158)..(188)

<223> Caja D

<400> 14
cagccaccaa agaggaccca gaattctagt cagccaccaa agaggaccca gaattctagt 60

cagccaccaa agaggaccca gaattctagt cagccaccaa agaggaccca gaattctagt 120

tacaattcaa acattgttca aacaaggaac ctctagttac aattcaaaca ttgttcaaac 180

aaggaacc 188

<210> 15
<211> 130
<212> ADN
<213> sintético

<220>
<221> amplificador
<222> (1)..(130)
<223> elemento amplificador sintético compuesto por el dímero de Caja Gst1 y el dímero de Caja D

<220>
<221> amplificador
<222> (1)..(25)
<223> Caja Gst1

<220>
<221> amplificador
<222> (32)..(56)
<223> Caja Gst1

<220>
<221> amplificador
<222> (63)..(93)
<223> Caja D

<220>
<221> amplificador
<222> (100)..(130)
<223> Caja D

<400> 15
ttctagccac cagatttgac caaactctag tttctagcca ccagatttga ccaaactcta 60

gttacaattc aaacattgtt caaacaagga acctctagtt acaattcaaa cattgttcaa 120

acaaggaacc 130

REIVINDICACIONES

1. Promotor sintético inducible por patógenos que es apropiado para la regulación de la transcripción de un ácido nucleico y está compuesto por varios elementos y comprende un promotor mínimo, así como al menos un elemento cis-regulador corriente arriba del promotor mínimo, caracterizado porque el promotor mínimo presenta un motivo de secuencia dbrmwa dispuesto corriente abajo de una región TATA y antes de un punto de inicio de transcripción dispuesto sobre el promotor mínimo, en el que empieza la transcripción del ácido nucleico que se tiene que regular y en el que el promotor sintético inducible por patógenos presenta además del promotor mínimo al menos un elemento cis-regulador con una secuencia de nucleótidos según una de las SEC. ID. Nº 10-15.

2. Promotor sintético inducible por patógenos según la reivindicación 1, caracterizado porque el promotor sintético inducible por patógenos con el motivo de secuencia dbrmwa provoca una actividad promedio del gen reportero en plantas de patata transgénicas no infectadas, la cual es inferior en comparación con un promotor sintético inducible por patógenos con un promotor mínimo 35S.

3. Promotor sintético inducible por patógenos según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el motivo de secuencia aparece dos o más veces en el promotor mínimo.

4. Promotor sintético inducible por patógenos según una de las reivindicaciones de la 1 a la 3, en el que el promotor mínimo presenta una secuencia de nucleótidos según una de las SEC. ID. Nº 1-7.

5. Gen recombinante con un Promotor sintético inducible por patógenos según una de las reivindicaciones de la 1 a la 4.

6. Células vegetales transgénicas en las que un promotor sintético inducible por patógenos según una de las reivindicaciones de la 1 a la 4 se integra en el ADN de la célula vegetal.

7. Planta transgénica con una célula vegetal según la reivindicación 6.

8. Semilla transgénica con una célula vegetal según la reivindicación 6.

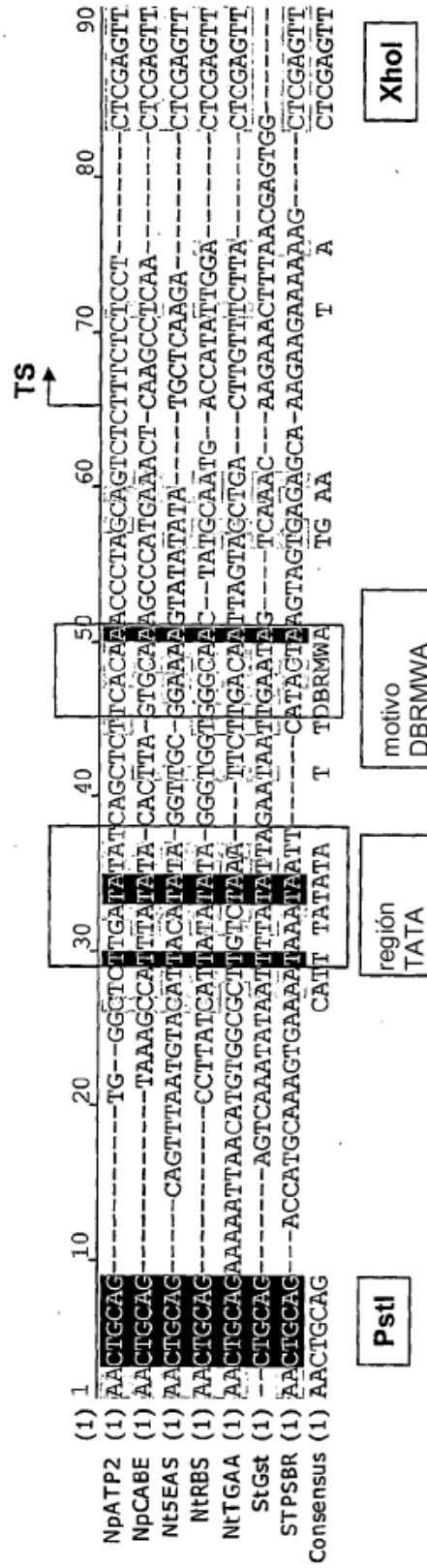
TS
PstI
región TATA
motivo DBRMWA
XhoI
NpATP2
NpCABE
Nt5EAS
NtRBS
NtTGAA
StGst
STPSBR
Consensus

Fig. 1

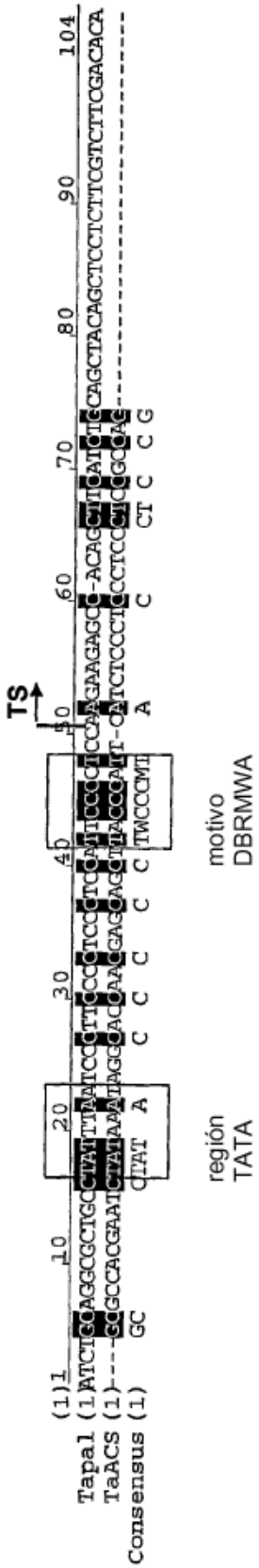

Fig. 2

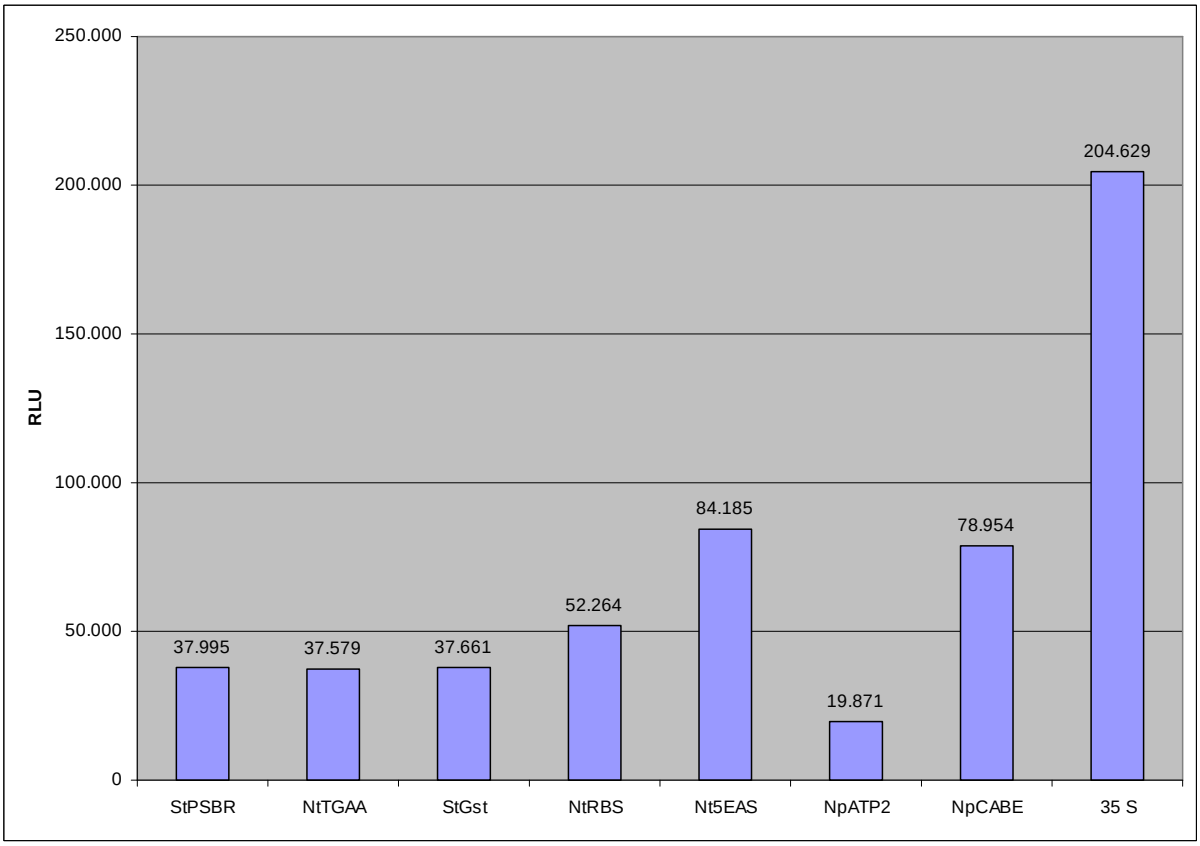
250.000
200.000
150.000
100.000
50.000
0
RLU
37.995
37.579
37.661
52.264
84.185
19.871
78.954
204.629
StPSBR
NtTGAA
StGst
NtRBS
Nt5EAS
NpATP2
NpCABE
35 S

Fig. 3

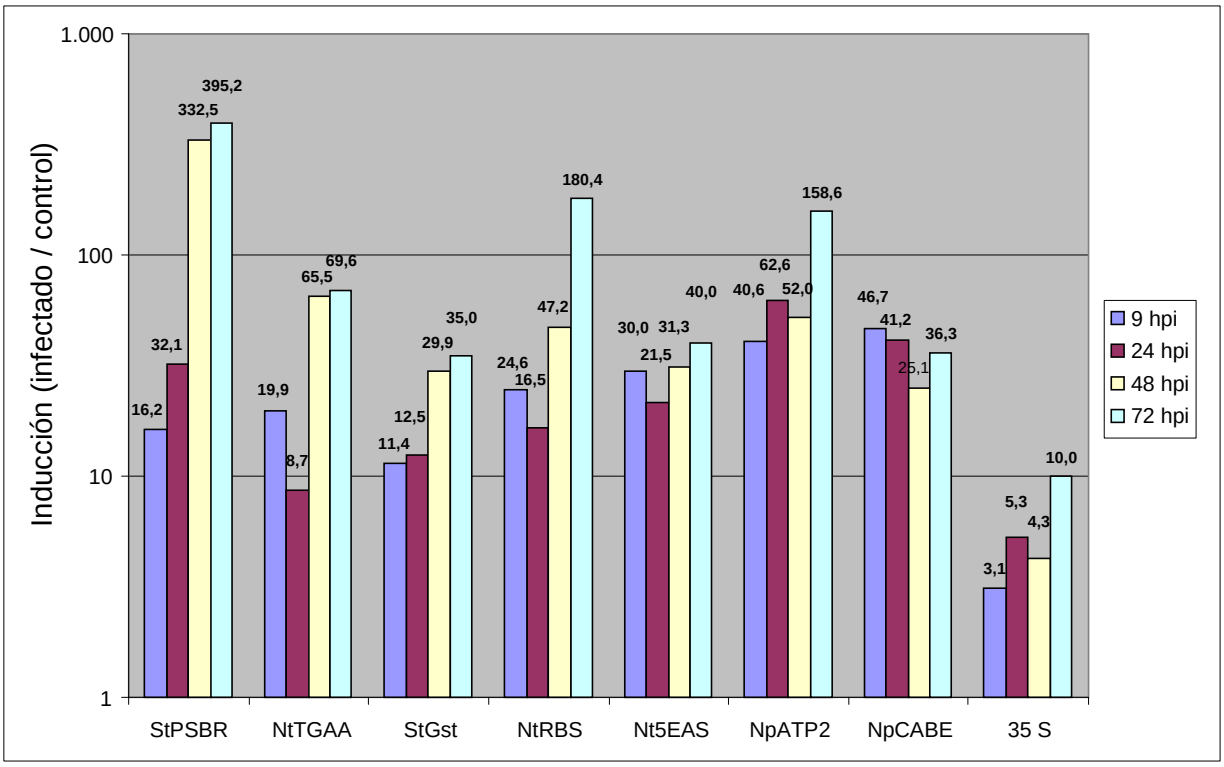
1.000
100
10
1
Inducción (infectado / control)
16,2
32,1
332,5
395,2
19,9
8,7
65,5
69,6
11,4
12,5
29,9
35,0
24,6
16,5
47,2
180,4
30,0
21,5
31,3
40,0
40,6
62,6
52,0
158,6
46,7
41,2
25,1
36,3
3,1
5,3
4,3
10,0
StPSBR
NtTGAA
StGst
NtRBS
Nt5EAS
NpATP2
NpCABE
35 S
9 hpi
24 hpi
48 hpi
72 hpi

Fig. 4

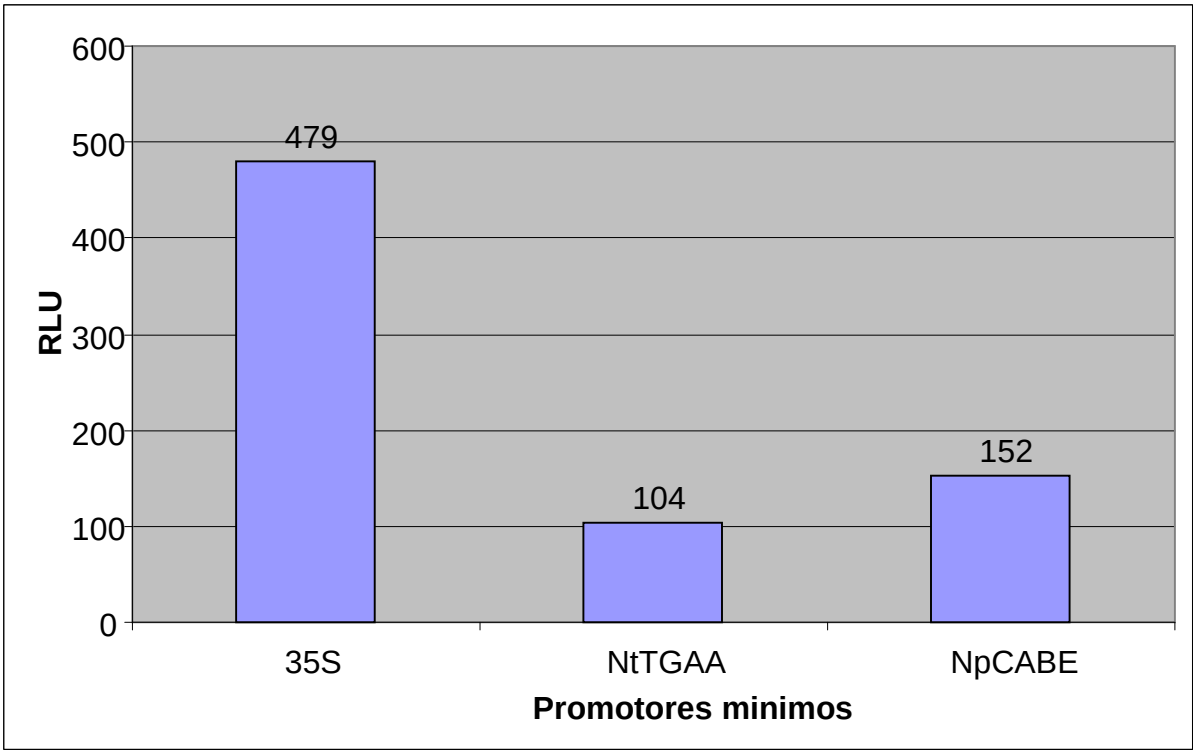
600
500
400
300
200
100
0
RLU
479
104
152
35S
NtTGAA
NpCABE
Promotores minimos

Fig. 5

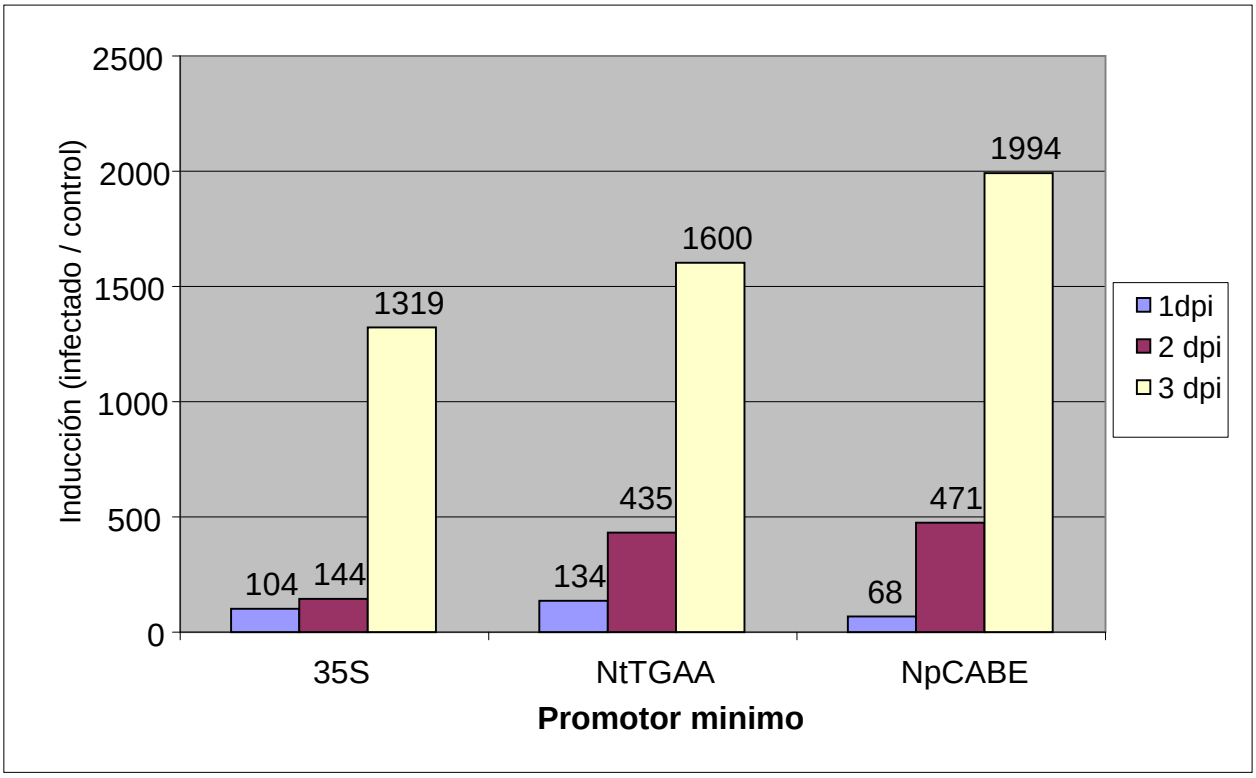
2500
2000
1500
1000
500
0
Inducción (infectado / control)
104
144
1319
134
435
1600
68
471
1994
35S
NtTGAA
NpCABE
Promotor minimo
1dpi
2 dpi
3 dpi

Fig. 6

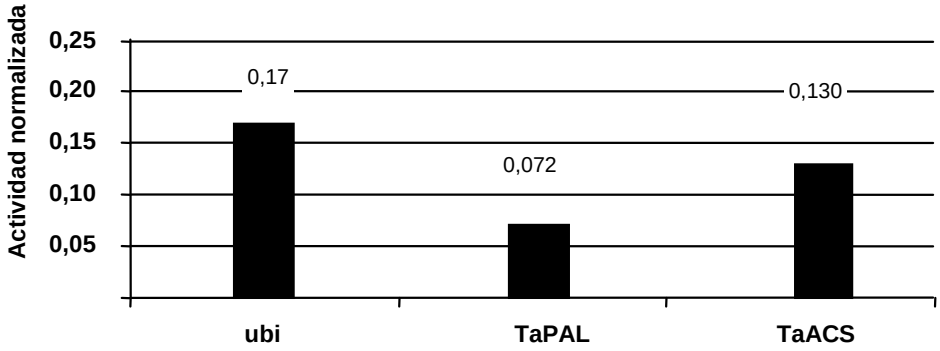
Actividad normalizada
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,17
0,072
0,130
ubi
TaPAL
TaACS

Fig. 7

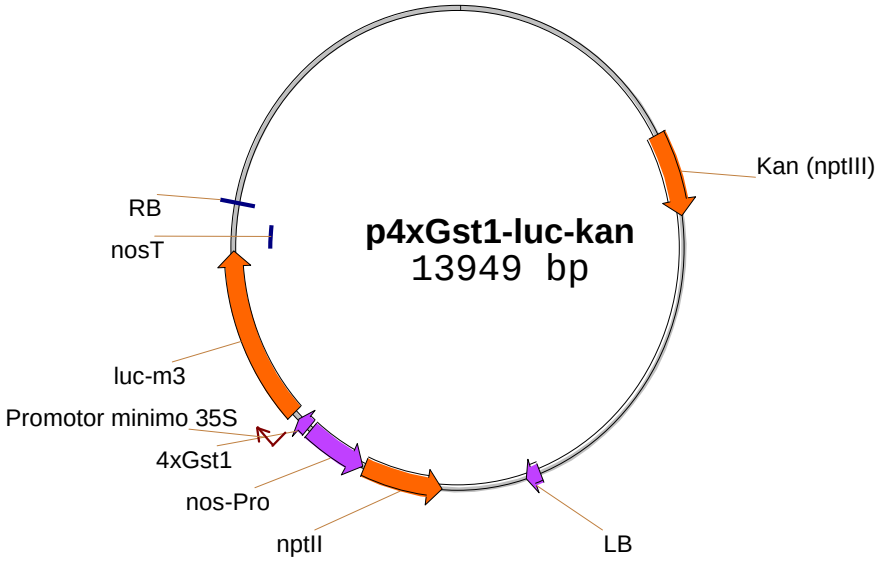
p4xGst1-luc-kan
13949 bp
Kan (nptIII)
RB
nosT
luc-m3
Promotor minimo 35S
4xGst1
nos-Pro
nptII
LB

Fig. 8

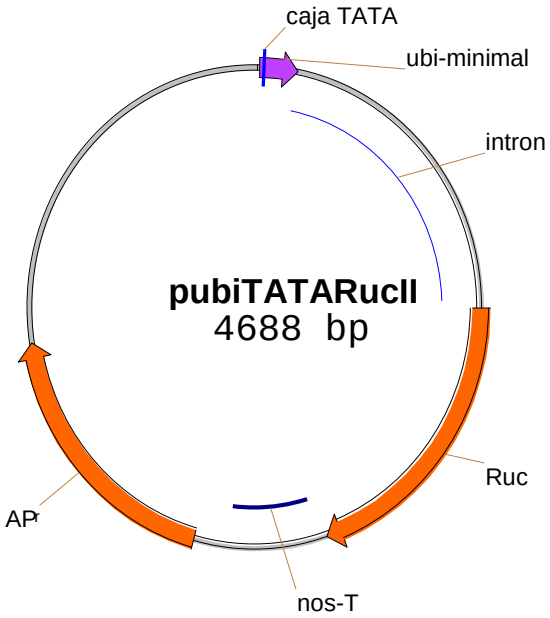
caja TATA
ubi-minimal
intron
pubiTATARucII
4688 bp
Ruc
AP
nos-T

Fig. 9