

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 529**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2008 E 08708632 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 2109678**

54 Título: **Promotores del gen de las plantas de tipo MtN3 inducibles por nemátodos y elementos reguladores relacionados**

30 Prioridad:

06.02.2007 US 899714 P

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

22.04.2013

73 Titular/es:

**BASF PLANT SCIENCE GMBH (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:

**WIIG, AARON;
HUANG, XIANG y
CHAUDHURI, SUMITA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 401 529 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

Promotores del gen de las plantas de tipo MtN3 inducibles por nemátodos y elementos reguladores relacionados

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con secuencias de promotores y elementos reguladores que regulan la transcripción de genes similares a los genes de tipo MtN3. Los promotores de genes de tipo MtN3 de la invención son útiles para controlar la transcripción de cualquier ácido nucleico de interés en las raíces de las plantas. En particular, los promotores de la invención se pueden utilizar para controlar la transcripción de ácidos nucleicos que codifican agentes que interrumpen la formación o el mantenimiento del sitio de alimentación, que interrumpen el crecimiento y/o la reproducción de nemátodos parasitarios de las plantas, que confieren o mejoran la resistencia de la planta a nemátodos parasitarios de las plantas, o que son tóxicos para los nemátodos parasitarios de las plantas a fin de reducir la destrucción de los cultivos.

Antecedentes de la invención

15 Los nemátodos son gusanos redondos microscópicos que se alimentan en las raíces, hojas y tallos de más de 2.000 cultivos en hileras, hortalizas, plantas frutales y ornamentales, causando una pérdida a nivel mundial de cultivos calculada en \$100 mil millones de dólares. Diversas especies de nemátodos parasitarios infectan las plantas de cultivo, incluyendo nemátodos de los nudos radiculares (RKN por sus siglas en inglés), nemátodos formadores de quistes y lesiones. Los nemátodos de los nudos radiculares, que se caracterizan por provocar la formación de agallas radiculares en los lugares de alimentación, tienen una variedad de huéspedes relativamente amplia y, por lo tanto, son patógenos en una gran cantidad de especies de cultivo. Las especies de nemátodos formadores de quistes y lesiones tienen una variedad de huéspedes más limitada, pero aún así causan pérdidas considerables en los cultivos susceptibles a ellos.

20 Los nemátodos patógenos se encuentran presentes en todo el territorio de Estados Unidos, pero las mayores concentraciones se presentan en las regiones cálidas y húmedas del sur y oeste, y en los suelos arenosos. Los nemátodos de quiste de la soja (*Heterodera glycines*), la plaga más grave de las plantas de soja, se descubrieron por primera vez en Estados Unidos en Carolina del Norte en 1954. Algunas áreas se encuentran tan infestadas por el nemátodo de quiste de la soja (SCN por sus siglas en inglés) que la producción de soja ya no es posible económicamente sin implementar medidas de control. A pesar de que la soja es el principal cultivo de importancia económica atacado por el SCN, el SCN parasita alrededor de cincuenta huéspedes en total, incluso cultivos de campo, hortalizas, plantas ornamentales y malezas.

25 Los signos del daño causado por nemátodos incluyen retraso en el crecimiento y amarillamiento de las hojas, y el marchitamiento de las plantas durante periodos de calor. Sin embargo, la infestación por nemátodos puede causar pérdidas de rendimiento significativas sin que aparezca ningún síntoma evidente de la enfermedad en las partes que se encuentran sobre el nivel del suelo. Las causas principales de la disminución del rendimiento se deben a los daños en la raíz por debajo del nivel del suelo. Las raíces infectadas por el SCN se vuelven pequeñas o se retrasa su crecimiento. La infestación por nemátodos también puede disminuir la cantidad de nódulos de fijación de nitrógeno en las raíces, y puede hacer que las raíces se vuelvan más susceptibles a los ataques por parte de otros patógenos de las plantas que se originan en el suelo.

30 El ciclo de vida del nemátodo tiene tres etapas principales: huevo, juvenil y adulta. El ciclo de vida varía entre las especies de nemátodos. Por ejemplo, el ciclo de vida del SCN usualmente se completa de 24 a 30 días en condiciones óptimas, mientras que otras especies pueden demorar un año, o más, para completar su ciclo de vida. Cuando los niveles de humedad y temperatura se vuelven adecuados durante la primavera, los jóvenes con forma de gusano eclosionan de los huevos en el suelo. Sólo los nemátodos en la etapa de desarrollo juvenil son capaces de infectar las raíces de la soja.

35 El ciclo de vida del SCN ha sido objeto de muchos estudios y, por lo tanto, son un ejemplo útil para comprender el ciclo de vida del nemátodo. Luego de penetrar las raíces de la soja, los SCN juveniles se mueven a través de la raíz hasta que entran en contacto con el tejido vascular, momento en el cual dejan de migrar y comienzan a alimentarse. Con un estilete, el nemátodo inyecta secreciones que modifican ciertas células de la raíz y las transforman en sitios de alimentación especializados. Las células de la raíz son transformadas morfológicamente en grandes sincitios de múltiples núcleos (o células gigantes en el caso de RKN), que se utilizan como fuente de nutrientes para los nemátodos. Los nemátodos que se alimentan activamente roban de esta forma nutrientes esenciales de la planta causando pérdidas de rendimiento. A medida que los nemátodos hembra se alimentan, se hinchan y eventualmente se vuelven tan grandes que sus cuerpos atraviesan el tejido radicular y quedan expuestos en la superficie de la raíz.

Luego de un período de alimentación, los nemátodos SCN macho, que no se hinchan en su adultez, migran fuera de la raíz hacia el suelo y fertilizan a las hembras adultas agrandadas. Los machos mueren después, mientras que las

- 5 hembras permanecen unidas al sistema radicular y continúan alimentándose. Los huevos en las hembras hinchadas comienzan a desarrollarse, inicialmente en una masa o saco de huevos fuera del cuerpo y luego dentro de la cavidad corporal del nemátodo. Eventualmente, toda la cavidad corporal de la hembra adulta se llena de huevos, y el nemátodo muere. Es el cuerpo lleno de huevos de la hembra muerta el que se denomina quiste. Los quistes finalmente se liberan y se los encuentra sueltos en el suelo. Las paredes del quiste se vuelven muy duras, brindando una excelente protección para los aproximadamente 200 a 400 huevos que contiene en su interior. Los huevos de SCN sobreviven dentro del quiste hasta que se dan las condiciones adecuadas para su eclosión. Aunque muchos de los huevos pueden eclosionar en el transcurso del primer año, muchos también sobrevivirán en los quistes protectores durante varios años.
- 10 Un nemátodo puede moverse por el suelo sólo unas pocas pulgadas por año por sus propios medios. Sin embargo, la infestación por nemátodos se puede expandir por grandes distancias en una variedad de formas. Cualquier cosa que pueda mover suelo infestado es capaz de esparcir la infestación, incluso la maquinarias, vehículos y herramientas agrícolas, viento, agua, animales y trabajadores agrícolas. Las partículas de suelo del tamaño de semillas a menudo contaminan la semilla cosechada. En consecuencia, la infestación por nemátodos se puede
- 15 esparcir cuando las semillas contaminadas de campos infestados se siembran en campos no infestados. Incluso existe evidencia de que ciertas especies de nemátodos se pueden esparcir a través de las aves. Sólo se pueden prevenir algunas de estas causas.
- 20 Las prácticas tradicionales para controlar la infestación por nemátodos incluyen: mantener los niveles adecuados de nutrientes y pH del suelo en las tierras infestadas por nemátodos; controlar otras enfermedades de las plantas, así como también plagas de insectos y malezas; utilizar prácticas sanitarias tales como arar, plantar y cultivar los campos infestados por nemátodos sólo luego de trabajar los campos no infestados; lavar muy bien el equipo con agua o vapor a alta presión luego de trabajar en campos infestados; no utilizar semillas que crezcan en tierras infestadas para sembrar en campos no infestados a menos que la semilla haya sido limpiada de forma adecuada; rotar los campos infestados y alternar los cultivos hospederos con cultivos no hospederos; utilizar nematicidas; y
- 25 plantar variedades de plantas resistentes.
- 30 Se han propuesto métodos para la transformación genética de plantas a fin de conferir mayor resistencia a los nemátodos parasitarios de las plantas. Las patentes estadounidenses Nos. 5.589.622 y 5.824.876 están orientadas a la identificación de genes de las plantas que se expresan específicamente en o cerca del sitio de alimentación de la planta luego de la unión del nemátodo. Las patentes estadounidenses Nos. 5.589.622 y 5.824.876 divulgan ocho promotores aislados de raíces de patata infectadas por *Globodera rostochiensis*: no se divulgan promotores inducibles por nemátodos de otras especies vegetales. Se considera que estos promotores son útiles para dirigir la expresión específica de proteínas o enzimas tóxicas, o la expresión de ARN antisentido para un gen objetivo o para genes celulares en general.
- 35 La patente estadounidense No. 5.023.179 divulga un elemento mejorador del promotor denominado ASF-1, aislado del promotor del CaMV, el cual se considera que mejora la expresión génica de las plantas en las raíces.
- La patente estadounidense No. 5.750.386 divulga un fragmento de supresión del promotor específico de la raíz RB7 de *Nicotiana tabacum*, el cual se considera que es sensible a los nemátodos.
- La patente estadounidense No. 5.837.876 divulga un promotor del gen específico de la corteza radicular aislado del tabaco y denominado TobRD2.
- 40 La patente estadounidense No. 5.866.777 divulga un enfoque de dos genes para demorar la formación de una estructura de alimentación del nemátodo. El primer gen, barnase, se encuentra bajo el control de un promotor que dirige la expresión al menos en la estructura de alimentación. El segundo gen, barstar, se encuentra bajo el control de un promotor que dirige la expresión en todas las células de la planta excepto en la estructura de alimentación. Los promotores específicos del sitio de alimentación divulgados en la patente estadounidense No. 5.866.777
- 45 incluyen versiones truncadas de los promotores $\Delta 0.3$ TobRB7 y rolC.
- La patente estadounidense No. 5.955.646 divulga regiones reguladoras quiméricas basadas en promotores derivados de los genes de manopina sintasa y octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, los cuales se consideran que son inducibles por nemátodos.
- La patente estadounidense No. 6.005.092 divulga al promotor de endo-1,4- β -glucanasa (Ntce17) de *N. tabacum*.
- 50 Las patentes estadounidenses Nos. 6.262.344 y 6.395.963 divulgan promotores aislados de *Arabidopsis thaliana*, los cuales se consideran que son inducibles por nemátodos.
- La patente estadounidense No. 6.448.471 divulga un promotor de *A. thaliana*, que es específico para sitios de alimentación de nemátodos.

La patente estadounidense No. 6.703.541 divulga la clonación y el aislamiento del gen P7X de peroxidasa del maíz y su promotor; se considera que el promotor es inducible por nemátodos.

5 La patente estadounidense No. 6.593.513 divulga la transformación de plantas con barnasa bajo el control del promotor del gen para endo-1,4-β-glucanasa (cel1) de *A. thaliana* para producir plantas capaces de interrumpir el ataque por nemátodos.

La patente estadounidense No. 6.906.241 divulga el uso del promotor Ntce17 en combinación con un ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína nematocida o insecticida.

10 La patente estadounidense No. 7.078.589 divulga la clonación y el aislamiento del promotor y del gen Pyk20 de la soja, los cuales se considera que son inducidos por infección de SCN y muestran una fuerte actividad en los tejidos vasculares.

La publicación de la solicitud de patente estadounidense No. 2003/0167507 divulga al promotor de isoflavona sintetasa I de soja, el cual se considera que es específico de raíz y es inducible en tejido vegetativo mediante ataque de parásitos.

15 La publicación de la solicitud de patente estadounidense No. 2004/0078841 divulga regiones promotoras de los promotores TUB-1, RPL16A y ARSK1 de *Arabidopsis thaliana* y el promotor PSMT_A de *Pisum sativum*, todos los cuales se consideran que son específicos de la raíz.

La publicación de la solicitud de patente estadounidense No. 2004/0029167 divulga una secuencia del promotor de un gen para O-metiltransferasa de ácido cafeico de clase II del tabaco, el cual se considera que es inducible en respuesta a una lesión mecánica o química o a la agresión por parte de un agente patógeno.

20 La publicación de la solicitud de patente estadounidense No. 2005/0262585 divulga un promotor de fosforribosilformilglicinamida ribonucleótido sintetasa de soja y fragmentos de supresión del mismo, los cuales se considera que son sensibles a la infección por nemátodos.

El documento WO 94/10320 divulga el fragmento del promotor Δ0.3TobRB7 del tabaco y su uso con una variedad de genes para la expresión específica en células que sirven para la alimentación de nemátodos.

25 El documento WO 03/033651 divulga secuencias sintéticas del promotor reguladas por nemátodos denominados SCP1, UCP3 y SUP.

30 El documento WO 2004/029222 y su contraparte estadounidense, la publicación de la solicitud de patente estadounidense No. 2005/0070697 divulgan regiones reguladoras de los genes para adenosina-5'-fosfato desaminasa e inositol-5-fosfatasa de soja, para uso en la mejora de la resistencia a los nemátodos por parte de las plantas.

35 Ninguno de los promotores específicos de la raíz o del sitio de alimentación antes mencionados se utilizan actualmente en semillas de uso comercial que contienen un transgén contra nemátodos. A pesar de que se ha reconocido desde hace largo tiempo la necesidad por tales productos, hasta el momento nadie ha logrado desarrollar plantas resistentes a los nemátodos a través de tecnología de ADN recombinante. Aún existe la necesidad de que promotores específicos de la raíz y/o de los sitios de alimentación de los nemátodos se combinen con transgenes que codifiquen agentes tóxicos para los nemátodos que parasitan las plantas.

Resumen de la invención

40 La invención provee polinucleótidos del promotor adecuados para uso en dirigir la expresión de un ácido nucleico en las raíces de una planta que son susceptibles al ataque por nemátodos. Los promotores de la invención son particularmente útiles para hacer que las plantas de cultivos agrícolas se vuelvan resistentes a la infestación por nemátodos.

En otra realización, la invención provee un promotor que comprende un polinucleótido del promotor aislado, capaz de mediar la expresión específica de la raíz y/o inducible por nemátodos, en donde el polinucleótido del promotor es seleccionado del grupo de polinucleótidos que consiste en:

45 a) un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1 ó 3;

b) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 748 a 998, o los nucleótidos 500 a 998, o los nucleótidos 573 a 922 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1;

c) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 400 a 609, o los nucleótidos 260 a 609, o los nucleótidos 200 a 609 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;

d) un polinucleótido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c);

5 e) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas a cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c);

f) un polinucleótido que comprende un fragmento de al menos 50 nucleótidos consecutivos, o al menos 100 nucleótidos consecutivos, o al menos 200 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en SEQ ID NO: 1 o 3.

10 Se describe un polinucleótido obtenido o que puede ser obtenido a partir de un fragmento genómico, que comprende un polinucleótido del promotor que es al menos 30% idéntico a cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta d), y que comprende un polinucleótido que codifica para una secuencia de polipéptidos, que es al menos 80% idéntica a una secuencia como la descrita por la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7 y que está ligada funcionalmente al polinucleótido del promotor que es al menos 30% idéntico a cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta d), o i) un polinucleótido que es un fragmento equivalente de cualquier polinucleótido de a) hasta f).

15 En una forma de realización adicional, la invención provee un método para reducir la expresión de genes esenciales para el desarrollo y el mantenimiento de un sitio de alimentación de los nemátodos, sincitios o célula gigante, mediante la interrupción de la función de los promotores de la presente invención utilizando métodos conocidos por aquellos capacitados en el arte, tales como secuencias antisentido o de ARNi.

20 La invención también se relaciona con casetes de expresión y con plantas transgénicas que comprenden a los polinucleótidos del promotor de la invención, y con métodos para controlar las infestaciones por nemátodos parasitarios en cultivos, en donde los métodos emplean construcciones de ácido nucleico recombinante que comprenden a los promotores de la invención en asociación operativa con un ácido nucleico que codifica un agente que interrumpe el metabolismo, el crecimiento y/o la reproducción de nemátodos parasitarios de la planta, que confiere o mejora la resistencia de las plantas a los nemátodos parasitarios de las plantas, o que es tóxico para los
25 nemátodos parasitarios de la planta a fin de reducir la destrucción de los cultivos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Secuencia de una región promotora de *A. thaliana* del locus At1g21460 (pWT128) (SEQ ID NO: 1; bases 830 - 836 de la caja TATA en negrita).

Figura 2: Secuencia de una región promotora de *A. thaliana* del locus At5g53190 (SEQ ID NO: 2).

30 Figura 3: Secuencia de una región promotora de *Glycine max* del gen correspondiente al clon de ADNc 47116125 (p-47116125) contenido en pAW222qcz (SEQ ID NO: 3; bases 513 - 519 de la caja TATA en negrita).

Figura 4: Secuencia del clon 47116125 de ADNc de *Glycine max* (SEQ ID NO: 4). El codón de inicio de orf se encuentra en negrita a partir de las bases 23 - 25. El codón de detención de orf se encuentra en negrita e itálicas a partir de las bases 785 - 787. El orf completo abarca las bases 23 - 787.

35 Figura 5: Alineamiento de secuencia de las secuencias de aminoácidos del clon 47116125 de ADNc de *Glycine max* (SEQ ID NO: 25), el locus At1g21460 de *A. thaliana* (SEQ ID NO: 26) y el locus At5g53190 de *A. thaliana* (SEQ ID NO: 27).

40 Figura 6: Secuencia de la secuencia derivada del desplazamiento sobre el genoma pAW127 (SEQ ID NO: 8). El codón de inicio para la secuencia de codificación de 47116125 está marcado en negrita y se localiza en 660 - 662 pb. Hay un codón de detención secuencia arriba de este codón de inicio en el mismo marco marcado en negrita e itálicas. La secuencia polinucleótidos del promotor clonada en pAW222qcz se representada por los nucleótidos desde la posición 51 hasta la 659.

45 Figuras 7a - b: Alineamiento de la secuencia del clon 47116125 de ADNc de *G. max* (SEQ ID NO: 4) y secuencia de *G. max* derivada del desplazamiento sobre el genoma contenida en pAW127 (SEQ ID NO: 8) que se dirige al clon 47116125 de ADNc. El codón de inicio ATG del clon 47116125 de ADNc de *G. max* (SEQ ID NO: 4) comienza en la posición del nucleótido 660 de la secuencia pAW127. Un polinucleótido del promotor de 609 pb se describe en la SEQ ID NO: 3 y se deriva de la posición del nucleótido 51 a 659 de la secuencia pAW127 (SEQ ID NO: 8).

Figura 8: Patrones de expresión de β -glucuronidasa de los vectores binarios pAW222qcz y pWT128 en el ensayo de la raíz vellosa de soja expuesto en el Ejemplo 3. Se tifieron las raíces vellosas infectadas por el nemátodo de quiste

de la soja y las raíces vellosas de control no infectadas 12 días después de inoculación con SCN. Se utilizó el siguiente índice de puntaje: “-” para ausencia de coloración con GUS, “+” para coloración leve con GUS, “++” para coloración fuerte con GUS.

5 Figura 9: Patrones de expresión de β -glucuronidasa de los vectores binarios pWT128 y las construcciones de supresión del polinucleótido del promotor RTJ113 y RTJ114 en el ensayo de la raíz vellosa de soja expuesto en el Ejemplo 5. Se tiñeron las raíces vellosas infectadas por el nemátodo de quiste de la soja y las raíces vellosas de control no infectadas 12 días después de inoculación con SCN. Se utilizó el siguiente índice de puntaje: “-” para ausencia de coloración con GUS, “+” para coloración leve con GUS, “++” para coloración fuerte con GUS.

10 Figura 10: Patrones de expresión de β -glucuronidasa de los vectores binarios pAW222qcz y las construcciones de supresión del polinucleótido del promotor RTJ117 y RTJ118 en el ensayo de la raíz vellosa de soja expuesto en el Ejemplo 5. Se tiñeron las raíces vellosas infectadas por el nemátodo de quiste de la soja y las raíces vellosas de control no infectadas 12 días después de inoculación con SCN. Se utilizó el siguiente índice de puntaje: “-” para ausencia de coloración con GUS, “+” para coloración leve con GUS, “++” para coloración fuerte con GUS.

15 Figura 11: Cebadores de PCR utilizados para obtener los polinucleótidos del promotor de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, la supresión de 500 pb del promotor de *A. thaliana* del locus At1g21460 (SEQ ID NO: 1), la supresión de 251 pb del promotor de *A. thaliana* del locus At1g21460 (SEQ ID NO: 1), la supresión de 410 pb del promotor de *Glycine max* p-47116125 (SEQ ID NO: 3) y la supresión de 210 pb del promotor de *Glycine max* p-47116125 (SEQ ID NO: 3).

20 Figura 12: Tabla que muestra fórmulas generales de secuencia (fórmula 1 y fórmula 2) de los elementos de la secuencia identificados en fragmentos mínimos del polinucleótido del promotor.

Figure 13: Secuencia general para el fragmento mínimo del polinucleótido del promotor de la región promotora de *A. thaliana* del locus At1g21460 (pWT128) (SEQ ID NO: 43) y tabla que muestra 16 elementos de la secuencia contenidos en la SEQ ID NO: 43.

25 Figure 14: Secuencia general para el fragmento mínimo del polinucleótido del promotor de la región promotora de *A. thaliana* del locus At5g53190 (SEQ ID NO: 44) y tabla que muestra 9 elementos de la secuencia contenidos en la SEQ ID NO: 44

Figure 15: Secuencia general para el fragmento mínimo del polinucleótido del promotor de la región promotora de *Glycine max* del gene correspondiente al clon de ADNc 47116125 (SEQ ID NO: 45) y tabla que muestra 7 elementos de la secuencia contenidos en la SEQ ID NO. 45

30 Descripción detallada de las formas de realización preferidas

35 La presente invención podrá ser comprendida más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de las formas de realización preferidas de la invención y los ejemplos incluidos allí. A menos que se indique otra cosa, los términos utilizados en la presente descripción deberán entenderse de acuerdo con el uso convencional que le otorgan aquellos capacitados en el arte pertinente. Además de las definiciones de los términos provistos a continuación, las definiciones de términos comunes en biología molecular también pueden encontrarse en Rieger et al., 1991 Glossary of genetics: classical and molecular, 5a Ed., Berlín: Springer-Verlag; y en Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., Eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley Sons, Inc., (Suplemento de 1988).

40 Se debe comprender que tal como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, “un” o “una” pueden significar uno o más, dependiendo del contexto en el cual se utilicen. De esta forma, por ejemplo, la referencia que se hace a “una célula” puede significar que se puede utilizar al menos una célula. Se debe comprender que esta invención no se limita a ácidos nucleicos específicos, tipos específicos de células, células huésped específicas, condiciones específicas o métodos específicos, etc., debido a que estos pueden, por supuesto, variar, y las numerosas modificaciones y variaciones dentro de estos serán evidentes para aquellos capacitados en el arte.

45 También se debe comprender que la terminología utilizada aquí es sólo con el fin de describir formas de realización específicas y no pretende ser limitativa.

50 A lo largo de la presente solicitud se hace referencia a diferentes publicaciones. Las técnicas estándar para clonación, aislamiento, amplificación y purificación de ADN, para reacciones enzimáticas que incluyen ADN ligasa, endonucleasas de restricción de ADN polimerasa y similares, y diferentes técnicas de separación son aquellas que aquellos capacitados en el arte conocen y emplean habitualmente. Una cantidad de técnicas estándar se describen en Sambrook y Russell, 2001 Molecular Cloning, Tercera Edición, Cold Spring Harbor, Plainview, Nueva York; Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, Nueva York; Maniatis et al., 1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, Nueva York; Wu (Ed.) 1993 Meth.

Enzymol. 218, Parte I; Wu (Ed.) 1979 Meth Enzymol. 68; Wu et al., (Eds.) 1983 Meth. Enzymol. 100 y 101; Grossman y Moldave (Eds.) 1980 Meth. Enzymol. 65; Miller (Ed.) 1972 Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York; Old y Primrose, 1981 Principles of Gene Manipulation, University of California Press, Berkeley; Schleif and Wensink, 1982 Practical Methods in Molecular Biology; Glover (Ed.) 1985 DNA Cloning Vol. I y II, IRL Press, Oxford, RU; Hames y Higgins (Eds.) 1985 Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, RU; y Setlow y Hollaender 1979 Genetic Engineering: Principles and Methods, Vols. 1 - 4, Plenum Press, Nueva York.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención se pueden proveer aislados y/o purificados de su ambiente natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o libre o sustancialmente libre de otros ácidos nucleicos de las especies de origen. Un ácido nucleico "aislado" tal como se utiliza en la presente invención también se encuentra sustancialmente libre - al momento de ser aislado - de otros materiales celulares o medio de cultivo cuando se lo produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos cuando se lo sintetiza químicamente. Los promotores de la invención son ácidos nucleicos aislados. Cuando se lo utiliza en la presente invención, el término "aislado" abarca todas estas posibilidades.

El término "alrededor de" se usa en la presente invención para significar aproximadamente, a grandes rasgos, cerca de, o en la región de. Cuando el término "alrededor de" se utiliza junto con un rango numérico, modifica ese rango extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término "alrededor de" se utiliza en la presente invención para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido en una variación del 10 por ciento, por encima o por debajo (mayor o menor).

El término "promotor" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una secuencia de ADN que, al ligarse a una secuencia de nucleótidos de interés, es capaz de controlar la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés en ARNm. Un promotor se localiza típicamente, aunque no necesariamente, 5' (por ejemplo, secuencia arriba) de un nucleótido de interés (por ejemplo, próximo al sitio de inicio de la transcripción de un gen estructural) cuya transcripción en ARNm él controla, y provee un sitio para la unión específica por medio de ARN polimerasa y otros factores de transcripción para el inicio de la transcripción. Un "promotor constitutivo" hace referencia a un promotor capaz de expresar el marco de lectura abierto o al elemento regulador que éste controla en todos o prácticamente todos los tejidos vegetales durante todas o prácticamente todas las etapas de desarrollo de la planta. "Promotor regulado" hace referencia a promotores que dirigen la expresión génica de forma no constitutiva, sino de manera temporal y/o espacial, e incluye tanto a los promotores específicos de tejido como a los promotores inducibles. Diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen o elemento regulador en diferentes tipos de células o tejidos, o en diferentes etapas del desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. "Promotor específico de tejido" hace referencia a promotores regulados que no se expresan en todas las células vegetales, sino sólo en uno o más tipos de células en órganos específicos (tales como raíces o semillas), tejidos específicos (tales como embrión o cotiledón) o tipos específicos de células (tales como parénquima de hoja o células de almacenamiento de semillas). "Promotor inducible" hace referencia a aquellos promotores regulados que se pueden activar en uno o más tipos de células mediante un estímulo externo, tal como un producto químico, luz, hormonas, estrés o un patógeno.

De acuerdo con la invención, los polinucleótidos del promotor de la presente invención se pueden colocar en asociación operativa con un segundo polinucleótido para expresión específica de la raíz y/o inducible por nemátodos del segundo polinucleótido en plantas a fin de variar el fenotipo de esa planta. Tal como se utilizan en la presente invención, los términos "en asociación operativa," "operativamente enlazado" y "asociado con" son intercambiables y significan la unión funcional de un polinucleótido del promotor y un segundo polinucleótido en un único fragmento de ácido nucleico de manera tal que se inicie y sea mediada la transcripción del segundo polinucleótido por el polinucleótido del promotor. En general, los ácidos nucleicos que se encuentran en asociación operativa son contiguos.

Las secuencias del segundo polinucleótido incluyen, por ejemplo, un marco de lectura abierto, una porción de un marco de lectura abierto, un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión, una secuencia antisentido, una secuencia que codifica una secuencia de ARN bicatenario, un transgén y similares. Por ejemplo, el segundo polinucleótido puede codificar un gen para resistencia a los insectos, un gen de resistencia a enfermedades bacterianas, un gen de resistencia a enfermedades causadas por hongos, un gen de resistencia a enfermedades virales, un gen de resistencia a enfermedades causadas por nemátodos, un gen de resistencia a herbicidas, un gen que afecta la calidad o composición del grano, un gen para utilización de nutrientes, un gen para reducción de micotoxinas, un gen para esterilidad de los machos, un gen marcador seleccionable, un gen marcador de cribado, un gen marcador seleccionable negativo, un gen marcador seleccionable positivo, un gen que afecta las características agronómicas de las plantas (es decir, el rendimiento), un gen de resistencia al estrés ambiental (como se ejemplifica mediante los genes que brindan resistencia o tolerancia a la sequía, el calor, las heladas, el congelamiento, la humedad excesiva, el estrés por salinidad o el estrés oxidativo), los genes que mejoran las propiedades o la cantidad de almidón, la calidad y cantidad del aceite, la composición de aminoácidos o proteínas y similares. En caso de que el promotor de la invención se utilice en plantas de la familia Fabaceae para mediar la expresión en nódulos radiculares, el segundo ácido nucleico puede ser un gen que afecte las características agronómicas de la

planta, tales como la fijación de nitrógeno, el transporte de nitrógeno, el contenido proteico de la planta o contenido proteico de la semilla y similares.

5 Preferentemente, el segundo polinucleótido codifica un ARN bicatenario (ARNbc) o un polinucleótido antisentido, que es sustancialmente idéntico u homólogo en todo o en parte a un gen de la planta necesario para la formación o el mantenimiento de un sitio de alimentación del nemátodo. El segundo polinucleótido puede codificar
 10 alternativamente un agente que interrumpe el crecimiento y/o la reproducción de los nemátodos que parasitan la planta, que confiere o mejora la resistencia de la planta a los nemátodos que la parasitan, o que es tóxico para los nemátodos que parasitan la planta a fin de reducir la destrucción de los cultivos. De acuerdo con la invención, se puede emplear cualquier polinucleótido que codifique un agente que interrumpa el crecimiento y/o la reproducción de
 15 nemátodos que parasiten las plantas, que confiera o mejore la resistencia de la planta a los nemátodos que la parasitan, o que sea tóxico para los nemátodos que parasitan las plantas. Por ejemplo, el segundo polinucleótido puede codificar un ARN bicatenario que sea sustancialmente idéntico a un gen objetivo de un nemátodo que parasita la planta que sea esencial para el metabolismo, la supervivencia, la metamorfosis o la reproducción del nemátodo. El segundo polinucleótido puede codificar un ARN bicatenario que sea sustancialmente idéntico a un gen
 20 de la planta en los sitios de alimentación de las raíces de la planta que sea esencial para la supervivencia de los nemátodos. Tal como se utiliza en la presente invención, teniendo en cuenta la sustitución de uracilo por timina al comparar las secuencias de ARN y ADN, los términos "sustancialmente idéntico" y "correspondiente a" significan que la secuencia de nucleótidos de una cadena del ARNbc es al menos alrededor de 80% - 90% idéntica a 20 ó más nucleótidos contiguos del gen objetivo, más preferiblemente, al menos alrededor de 90 - 95% idéntica a 20 ó más nucleótidos contiguos del gen objetivo y lo más preferible, al menos alrededor de 95 - 99% idéntica o absolutamente idéntica a 20 ó más nucleótidos contiguos del gen objetivo. Los ejemplos de genes objetivo de nemátodos que parasitan plantas ejemplares se exponen, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente estadounidense No. 2005/188438, pendiente de ser concedida junto con la presente asignada en forma común.

25 Alternativamente, para el control de nemátodos, el segundo polinucleótido ubicado en asociación operativa con los promotores de la invención puede codificar una proteína tóxica para los nemátodos. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican toxinas microbianas o sus fragmentos, toxinas o sus fragmentos derivados de insectos, tales como los descritos en las patentes estadounidenses Nos. 5.457.178; 5.695.954; 5.763.568; 5.959.182; y similares, son útiles en esta forma de realización de la invención.

30 Alternativamente, los nemátodos se pueden controlar mediante la interrupción o erradicación de los sitios de alimentación, células gigantes o sincitiales, utilizando un método para reducir la expresión de los genes esenciales para el desarrollo y mantenimiento de un sitio de alimentación de los nemátodos, células gigantes o sincitiales, mediante la interrupción de la función de los promotores de la presente invención utilizando los métodos conocidos por aquellos capacitados en el arte tales como secuencias antisentido o de ARNi.

35 Las plantas de cultivo y los correspondientes nemátodos patógenos se enumeran en el Index of Plant Diseases in the United States (Manual del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos No. 165, 1960); Distribution of Plant-Parasitic Nematode Species in North America (Society of Nematologists, 1985); y Fungi on Plants and Plant Products in the United States (American Phytopathological Society, 1989). Por ejemplo, los nemátodos que parasitan las plantas que son el objetivo de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, nemátodos formadores de quistes y nemátodos de nudos radiculares. Los nemátodos específicos que parasitan las plantas que son el objetivo
 40 de la presente invención incluyen, sin limitación, *Heterodera glycines*, *Heterodera schachtii*, *Heterodera avenae*, *Heterodera oryzae*, *Heterodera cajani*, *Heterodera trifolii*, *Globodera pallida*, *G. rostochiensis*, o *Globodera tabacum*, *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. javanica*, *M. naasi*, *M. exigua*, *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus angustus*, *Radopholus similis*, *Radopholus citrophilus*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Pratylenchus coffeae*, *Pratylenchus brachyurus*, *Pratylenchus vulnus*, *Paratylenchus curvatus*, *Paratylenchus zaeae*, *Rotylenchulus reniformis*, *Paratrichodorus anemones*, *Paratrichodorus minor*, *Paratrichodorus christiei*, *Anguina tritici*, *Bidera avenae*, *Subanguina radicolica*, *Hoplolaimus seinhorsti*, *Hoplolaimus Columbus*, *Hoplolaimus galeatus*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Hemicycliophora arenaria*, *Rhadinaphelenchus cocophilus*, *Belonolaimus longicaudatus*, *Trichodorus primitivus*, *Nacobbus aberrans*, *Aphelenchoides besseyi*, *Hemicriconemoides kanayaensis*, *Tylenchorhynchus claytoni*, *Xiphinema americanum*, *Cacopaurus pestis* y similares.

50 En una forma de realización, los nemátodos objetivo pertenecen a las familias de nemátodos que inducen células sincitiales o gigantes. Los nemátodos que inducen células gigantes o sincitiales pertenecen a las familias Longidoridae, Trichodoridae, Heterodidae, Meloidogynidae, Pratylenchidae o Tylenchulidae. En particular a las familias Heterodidae y Meloidogynidae.

55 Por lo tanto, en una forma de realización adicional, los nemátodos objetivo pertenecen a uno o más géneros seleccionados del grupo de *Nacobbus*, *Cactodera*, *Dolichodera*, *Globodera*, *Heterodera*, *Punctodera*, *Longidorus* o *Meloidogyne*. En una forma de realización preferida, los nemátodos objetivo pertenecen a uno o más géneros seleccionados del grupo de *Nacobbus*, *Cactodera*, *Dolichodera*, *Globodera*, *Heterodera*, *Punctodera* o *Meloidogyne*. En una forma de realización más preferida, los nemátodos objetivo pertenecen a uno o más géneros seleccionados del grupo de *Globodera*, *Heterodera* o *Meloidogyne*. En incluso una forma de realización adicional más preferida, los

nemátodos objetivo pertenecen a uno o ambos géneros seleccionados del grupo de Globodera o Heterodera. En una forma de realización adicional, los nemátodos objetivo pertenecen al género Meloidogyne.

5 Cuando los nematodos objetivo son del género Globodera, las especies pueden ser seleccionadas del grupo que consiste de *G. achilleae*, *G. artemisiae*, *G. hypolysi*, *G. mexicana*, *G. millefolii*, *G. mali*, *G. pallida*, *G. rostochiensis*, *G. tabacum* y *G. virginiae*. En una forma de realización preferida, el nemátodo Globodera objetivo incluye al menos a una de las especies de *G. pallida*, *G. tabacum* o *G. rostochiensis*. Cuando el nemátodo objetivo es del género Heterodera, las especies pueden ser seleccionadas del grupo de *H. avenae*, *H. carotae*, *H. ciceri*, *H. cruciferae*, *H. delvii*, *H. elachista*, *H. filipjevi*, *H. gambiensis*, *H. glycines*, *H. goettingiana*, *H. graduni*, *H. humuli*, *H. hordecalis*, *H. latipons*, *H. major*, *H. medicaginis*, *H. oryzicola*, *H. pakistanensis*, *H. rosii*, *H. sacchari*, *H. schachtii*, *H. sorghi*, *H. trifolii*, *H. urticae*, *H. vigni* y *H. zeae*. En una forma de realización preferida, los nemátodos Heterodera objetivo incluyen al menos a una de las especies de *H. glycines*, *H. avenae*, *H. cajani*, *H. goettingiana*, *H. trifolii*, *H. zeae* o *H. schachtii*. En una forma de realización más preferida, los nemátodos objetivo incluyen al menos una de las especies *H. glycines* o *H. Schachtii*. En la forma de realización más preferida, el nemátodo objetivo es la especie *H. glycines*.

15 Cuando los nematodos objetivo son del género Meloidogyne, el nematodo objetivo puede ser seleccionado del grupo que consiste en *M. acronea*, *M. arabica*, *M. arenaria*, *M. artiellia*, *M. brevicauda*, *M. camelliae*, *M. chitwoodi*, *M. coffeicola*, *M. esigua*, *M. graminicola*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. indica*, *M. inornata*, *M. javanica*, *M. lini*, *M. mali*, *M. microcephala*, *M. microtyla*, *M. naasi*, *M. salasi* y *M. thamesi*. En una forma de realización preferida, los nemátodos objetivo incluyen al menos a una de las especies *M. javanica*, *M. incognita*, *M. hapla*, *M. arenaria* o *M. chitwoodi*.

20 Cualquier especie vegetal se puede transformar con los polinucleótidos del promotor de la invención. Por ejemplo, las plantas que se pueden transformar con construcciones de ácidos nucleicos que contienen los polinucleótidos del promotor de la presente invención incluyen, sin limitación, plantas de un género seleccionado del grupo que consiste en *Medicago*, *Lycopersicon*, *Brassica*, *Cucumis*, *Solanum*, *Juglans*, *Gossypium*, *Malus*, *Vitis*, *Antirrhinum*, *Populus*, *Fragaria*, *Arabidopsis*, *Picea*, *Capsicum*, *Chenopodium*, *Dendranthema*, *Pharbitis*, *Pinus*, *Pisum*, *Oryza*, *Zea*, *Triticum*, *Triticale*, *Secale*, *Lolium*, *Hordeum*, *Glycine*, *Pseudotsuga*, *Kalanchoe*, *Beta*, *Helianthus*, *Nicotiana*, *Cucurbita*, *Rosa*, *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Digitaiis*, *Majorana*, *Ciahorium*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Heterocallis*, *Nemesis*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Browaalia*, *Phaseolus*, *Avena* y *Allium*.

30 Los derivados y variantes de los polinucleótidos del promotor pueden ser usados preferiblemente en clados, familias, géneros o especies vegetales particulares. Los derivados y las variantes de los polinucleótidos del promotor que pueden ser aislados de una especie de planta, se utilizan preferentemente en plantas del mismo clado, familia, género o especie de plantas a la cual pertenece la planta que se utiliza para aislar el derivado y la variante de los polinucleótidos del promotor. Por lo tanto, en una forma de realización, la planta es una planta monocotiledónea, preferentemente una planta de la familia de Poaceae, Musaceae, Liliaceae o Bromeliaceae, preferentemente de la familia de Poaceae. Conforme a ello, en aún una forma de realización adicional, la planta es una planta Poaceae del género *Zea*, *Triticum*, *Oryza*, *Hordeum*, *Secale*, *Avena*, *Saccharum*, *Sorghum*, *Pennisetum*, *Setaria*, *Panicum*, *Eleusine*, *Miscanthus*, *Brachypodium*, *Festuca* o *Lolium*. Cuando la planta es del género *Zea*, la especie preferida es *Z. mays*. Cuando la planta es del género de *Triticum*, la especie preferidas es *T. aestivum*, *T. speltae* o *T. durum*. Cuando la planta es del género *Oryza*, la especie preferida es *O. sativa*. Cuando la planta es del género *Hordeum*, la especie preferida es *H. vulgare*. Cuando la planta es del género de *Secale*, la especie preferida es *S. cereale*. Cuando la planta es del género de *Avena*, la especie preferida es *A. sativa*. Cuando la planta es del género *Saccarum*, la especie preferida es *S. officinarum*. Cuando la planta es del género *Sorghum*, la especie preferida es *S. vulgare*, *S. bicolor* o *S. sudanense*. Cuando la planta es del género *Pennisetum*, la especie preferida es *P. glaucum*. Cuando la planta es del género de *Setaria*, la especie preferida es *S. italica*. Cuando la planta es del género *Panicum*, la especie preferida es *P. miliaceum* o *P. virgatum*. Cuando la planta es del género de *Eleusine*, la especie preferida es *Eleusine coracana*. Cuando la planta es del género *Miscanthus*, la especie preferida es *M. sinensis*. Cuando la planta es del género *Brachypodium*, la especie preferida es *B. distachyon*. Cuando la planta es del género *Festuca*, la especie preferida es *F. arundinaria*, *F. rubra* o *F. pratensis*. Cuando la planta es del género *Lolium*, la especie preferida es *L. perenne* o *L. multiflorum*. Alternativamente, la planta puede ser *Triticosecale*.

50 Alternativamente, en una forma de realización, la planta es una planta dicotiledónea, preferentemente una planta de la familia de Fabaceae, Solanaceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, Malvaceae, Linaceae, Euphorbiaceae, Convolvulaceae, Rosaceae, Cucurbitaceae, Theaceae, Rubiaceae, Sterculiaceae o Citrus. En una forma de realización, la planta es una planta de la familia de Fabaceae, Solanaceae o Brassicaceae. Por lo tanto, en una forma de realización, la planta es de la familia Fabaceae, preferentemente del género *Glycine*, *Pisum*, *Arachis*, *Cicer*, *Vicia*, *Phaseolus*, *Lupinus*, *Medicago* o *Lens*. Las especies preferidas de la familia Fabaceae son *M. truncatula*, *M. sativa*, *G. max*, *P. sativum*, *A. hypogea*, *C. arietinum*, *V. faba*, *P. vulgaris*, *Lupinus albus*, *Lupinus luteus*, *Lupinus angustifolius* o *Lens culinaris*. Las más preferidas son las especies *G. Max*, *A. Hipogea* y *M. sativa*. La más preferida es la especie *G. max*. Cuando la planta es de la familia Solanaceae, el género preferido es *Solanum*, *Lycopersicon*, *Nicotiana* o *Capsicum*. Las especies preferidas de la familia Solanaceae son *S. tuberosum*, *L. esculentum*, *N. tabaccum* o *C. chinense*. La más preferida es *S. tuberosum*. Por lo tanto, en una forma de

- 5 realización, la planta es de la familia Brassicaceae, preferentemente del género Arabidopsis, Brassica o Raphanus. Las especies preferidas de la familia Brassicaceae son las especies de A. thaliana, B. napus, B. oleracea, B. juncea o B. rapa. La más preferida es la especie B. napus. Cuando la planta es de la familia Chenopodiaceae, el género preferido es Beta y la especie preferida es la B. vulgaris. Cuando la planta es de la familia de Asteraceae, el género preferido es Helianthus y la especie preferida es H. annuus. Cuando la planta es de la familia de Malvaceae, el género preferido es Gossypium o Abelmoschus. Cuando el género es Gossypium, la especie preferida es G. hirsutum o G. barbadense y la especie más preferida es G. hirsutum. Una especie preferida del género Abelmoschus es la especie A. esculentus. Cuando la planta es de la familia de Linaceae, el género preferido es Linum y la especie preferida es L. usitatissimum. Cuando la planta es de la familia Euphorbiaceae, el género preferido es Manihot, 10 Jatropha o Rhizinus y las especies preferidas son M. Esculenta, J. curcas o R. communis. Cuando la planta es de la familia Convolvulaceae, el género preferido es Ipomea y la especie preferida es I. batatas. Cuando la planta es de la familia Rosaceae, el género preferido es Rosa, Malus, Pyrus, Prunus, Rubus, Ribes, Vaccinium o Fragaria y la especie preferida es el híbrido Fragaria x ananassa. Cuando la planta es de la familia de Cucurbitaceae, el género preferido es Cucumis, Citrullus o Cucurbita y la especie preferida es Cucumis sativus, Citrullus lanatus, o Cucurbita 15 pepo. Cuando la planta es de la familia Theaceae, el género preferido es Camellia y la especie preferida es C. sinensis. Cuando la planta es de la familia Rubiaceae, el género preferido es Coffea y la especie preferida es C. arabica o C. canephora. Cuando la planta es de la familia de Sterculiaceae, el género preferido es Theobroma y la especie preferida es T. cacao. Cuando la planta es del género Citrus, la especie preferida es C. sinensis, C. limon, C. reticulata, C. maxima e híbridos de la especie Citrus o similares.
- 20 El polinucleótido del promotor de Arabidopsis de la invención, SEQ ID NO: 1 y la aquí descrita SEQ ID NO: 2, representa regiones del promotor de los homólogos de Arabidopsis del clon 47116125 de ADNc de la soja (SEQ ID NO: 4), la secuencia codificadora se registra como gen de tipo Nodulina 3 de Medicago truncatula (de tipo MtN3). Los polinucleótidos del promotor de Arabidopsis se aislaron del ADN genómico de Arabidopsis como se divulga en el Ejemplo 2. El polinucleótido del promotor de tipo MtN3 de la soja de la presente invención (SEQ ID NO: 3) se aisló 25 del ADN genómico de la soja como se divulga en el Ejemplo 1. Como se demuestra en el Ejemplo 3, cuando se colocaron los polinucleótidos del promotor de la soja y de Arabidopsis de la invención en asociación operativa con un gen reportero para GUS, la expresión del gen para GUS se redujo en las raíces vellosas de la soja infectadas por nemátodos.
- 30 De este modo, la invención está incluida en un promotor que comprende un polinucleótido del promotor aislado que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, o un fragmento mínimo del polinucleótido del promotor derivado de un polinucleótido aislado del promotor que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 3, que es capaz de dirigir la expresión específica de raíz y/o inducible por nemátodos de un segundo polinucleótido. Los métodos divulgados en la presente invención se pueden emplear para aislar fragmentos mínimos adicionales del polinucleótido del promotor de la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 3 35 que son capaces de mediar la expresión específica de raíz y/o inducible por nemátodos de un segundo polinucleótido.
- 40 Alternativamente, el promotor de la invención comprende un polinucleótido aislado del promotor que se hibrida en condiciones rigurosas a un ácido nucleico que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 3 o un fragmento mínimo del polinucleótido del promotor derivado de un polinucleótido aislado del promotor que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 3. Las condiciones de hibridación rigurosas tal como se utilizan en la presente invención son bien conocidas, incluyendo, por ejemplo, hibridación con NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, a 60°C durante 12 - 16 horas; seguido por un lavado en 0,1% de SDS, 0,1% de SSC a aproximadamente 65°C durante alrededor de 15 - 60 minutos. La invención también está comprendida en un polinucleótido aislado del promotor capaz de dirigir la expresión específica de la raíz y/o 45 inducible por nemátodos de un segundo polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido del promotor que comprende los nucleótidos 748 a 998 o 500 a 998 o 573 a 922 de una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1; un ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas a un ácido nucleico que comprende los nucleótidos 400 a 609 o 260 a 609 o 200 a 609 de una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3; en donde el polinucleótido del promotor es inducido en las raíces de una planta por nemátodos que la parasitan.
- 50 El promotor de la invención comprende además un polinucleótido aislado del promotor capaz de dirigir la expresión específica de la raíz y/o inducible por nemátodos de un segundo polinucleótido que es al menos 70 - 80%, 80 - 85%, 85 - 90%, 90 - 95%, o al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, idéntico o similar a un ácido nucleico que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1 o 3, o un fragmento mínimo del polinucleótido del promotor derivado de un ácido nucleico que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1 o 3. La longitud de la 55 comparación de la secuencia para polinucleótidos es de al menos 50 nucleótidos consecutivos, o al menos 100 nucleótidos consecutivos, o al menos 200 nucleótidos consecutivos, o al menos 500 nucleótidos consecutivos, hasta la longitud total de la secuencia. En caso de que las dos secuencias que se comparan no tengan una longitud idéntica, el término "la longitud total de la secuencia" se refiere a la longitud total de la secuencia más corta.
- 60 Se describe un promotor que comprende un polinucleótido aislado del promotor capaz de dirigir la expresión específica de la raíz y/o inducible por nemátodos de un segundo polinucleótido que es al menos 70 - 80%, 80 - 85%,

85 - 90%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntico o es idéntico a un ácido nucleico que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 43, 44 o 45. El polinucleótido aislado del promotor que es similar a una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 43, 44 o 45 es 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 nucleótidos más corto que una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 43, 44 o 45.

5 El polinucleótido aislado del promotor es al menos 70 - 80%, 80 - 85%, 85 - 90%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntico o es idéntico a un ácido nucleico que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 43, y es más corta que la SEQ ID NO: 43 en 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 nucleótidos, o no es más corta que la SEQ ID NO: 43. Preferiblemente, el polinucleótido aislado del promotor contiene al menos 10, 11, 12, 13, 14, o todos los elementos como se describe en la Figura 13 y que está posicionado en la misma cadena de polinucleótidos (cadena - o +) como la descrita en la tabla de la Figura 13. Preferiblemente, los elementos en la Figura 13 tienen una secuencia como la descrita por la SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 o 42 de acuerdo con la Figura 12, más preferiblemente tienen una secuencia como la descrita por la SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 o 42 de acuerdo con la Figura 12.

15 El polinucleótido aislado del promotor es al menos 70 - 80%, 80 - 85%, 85 - 90%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica o es idéntica a un ácido nucleico que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 44, y es más corta que la SEQ ID NO: 44 en 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 nucleótidos o no es más corta que la SEQ ID NO: 44. Preferiblemente, el polinucleótido aislado del promotor contiene al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8 o todos los elementos como se describe en la Figura 14 y está posicionado en la misma cadena de polinucleótidos (cadena - o +) como se describe en la tabla de la Figura 14. Preferiblemente, los elementos en la Figura 14 tienen una secuencia como la descrita por la SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 41 o 42, de acuerdo con la Figura 12, más preferiblemente tienen una secuencia como la descrita por la SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 39, 41 o 42 de acuerdo con la Figura 12.

25 El polinucleótido aislado del promotor es al menos 70 - 80%, 80 - 85%, 85 - 90%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica o es idéntica a un ácido nucleico que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 45, y es más corta que la SEQ ID NO: 45 en 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 nucleótidos o no es más corta que la SEQ ID NO: 45. Preferiblemente, el polinucleótido aislado del promotor contiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o todos los elementos como se describe en la Figura 15 y está posicionado en la misma cadena de polinucleótidos (cadena - o +) como se describe en la tabla de la Figura 15. Preferiblemente los elementos en la Figura 15 tienen una secuencia como la descrita por la SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 31, 34, 35, 36, 37, 38 o 40, de acuerdo con la Figura 12, más preferiblemente tienen una secuencia como la descrita por la SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38 o 40 de acuerdo con la Figura 12.

35 El término "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o de polipéptidos hace referencia a aquellas posiciones en las dos secuencias donde pares idénticos de símbolos caen juntos cuando se alinean las secuencias para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación especificada, por ejemplo, ya sea la secuencia entera como en un alineamiento global o la región de similitud en una alineación local. Cuando el porcentaje de identidad de secuencia se utiliza en referencia a proteínas, se reconoce que las posiciones de los residuos que no son idénticas a menudo difieren en las sustituciones conservadoras de aminoácidos, donde los residuos de aminoácidos son sustituidos por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y, por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en las sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia se puede ajustar en forma ascendente para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren en dichas sustituciones conservadoras tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los expertos en el arte conocen los medios para realizar este ajuste. Típicamente, esto incluye calificar una sustitución conservadora como una coincidencia parcial en lugar de calificarla como una falta de coincidencia, y aumentando de esta manera el porcentaje de similitud de secuencia.

45 Tal como se utiliza en la presente invención, "porcentaje de identidad de secuencia" indica un valor determinado al observar primero en dos secuencias óptimamente alineadas respecto de una ventana de comparación, ya sea global o localmente, en cada posición del constituyente, en cuanto a si el residuo de aminoácido o de la base de ácido nucleico idéntica está presente en ambas secuencias, denotada como una coincidencia, o si no, denotada como una falta de coincidencia. Debido a que dichos alineamientos se construyen optimizando la cantidad de bases que coincidan, mientras al mismo tiempo se permite tanto la falta de coincidencia en cualquier posición y para la introducción de espacios de cualquier tamaño, como regiones nulas o vacías en donde realizar esto aumenta el significado o la calidad de la alineación, el cálculo determina la cantidad total de posiciones para las cuales existe la condición de coincidencia y luego divide este número por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación, y finalmente multiplica el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. El "porcentaje de similitud de secuencia" para las secuencias de proteína se puede calcular mediante el mismo principio, en donde la sustitución conservadora se calcula como una falta de coincidencia parcial en lugar de una falta de coincidencia total. De este modo, por ejemplo, cuando un aminoácido idéntico se califica con 1 y una sustitución no conservadora se califica con 0, una sustitución conservadora se califica entre 0 y 1. La calificación de sustituciones conservadoras se puede obtener a partir de matrices de aminoácidos conocidas en el arte, por

ejemplo, matrices Blosum o PAM.

5 Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en el arte. La determinación del porcentaje de identidad o porcentaje de similitud (para proteínas) entre dos secuencias se puede lograr mediante un algoritmo matemático. Los ejemplos preferidos, no limitantes de dichos algoritmos matemáticos son el algoritmo de Myers y Miller (Bioinformatics, 4(1): 11 - 17, 1988), la alineación global de Needleman-Wunsch (J. Mol. Biol., 48(3): 443 - 53, 1970), la alineación local de Smith-Waterman (J. Mol. Biol., 147: 195 - 197, 1981), el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (PNAS, 85(8): 2444 - 2448, 1988), el algoritmo de Karlin y Altschul (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215(3): 403 - 410, 1990; PNAS, 90: 5873 - 5877, 1993). Las implementaciones en ordenador de estos algoritmos matemáticos se pueden utilizar para la comparación de secuencias a fin de determinar la identidad de secuencia o para identificar homólogos.

15 La invención también abarca "variantes" o "derivados" de los polinucleótidos del promotor de la invención. Los derivados de las secuencias específicas de polinucleótidos del promotor y sus elementos específicos pueden incluir, pero sin limitarse a, supresión de secuencias, mutaciones puntuales únicas o múltiples, alteraciones en un sitio en particular de la enzima de restricción, adición de elementos funcionales, u otros medios de modificación molecular. Esta modificación puede o no mejorar o bien alterar la actividad reguladora de la transcripción de dicho polinucleótido del promotor.

20 Por ejemplo, un experto en el arte puede delimitar los elementos funcionales, por ejemplo elementos del promotor tales como, pero sin limitarse a, sitios de enlazamiento del factor de transcripción dentro de las secuencias y suprimir cualquiera de los elementos funcionales no esenciales. Los elementos funcionales se pueden modificar o combinar para aumentar la utilidad o aumentar el nivel de expresión de los polinucleótidos del promotor de la invención para cualquier aplicación en particular.

25 El término "fragmento equivalente" o "fragmento mínimo del polinucleótido del promotor" tal como se utiliza en la presente invención hace referencia a un fragmento de un polinucleótido del promotor que es capaz de mediar la expresión específica de la raíz y/o inducible por nemátodos de un segundo polinucleótido. Los fragmentos funcionalmente equivalentes de un polinucleótido del promotor de la invención también se pueden obtener mediante remoción, por ejemplo mediante supresión de elementos funcionales no esenciales sin suprimir los que sean esenciales, por ejemplo los sitios de enlazamiento del factor de transcripción. La reducción del polinucleótido del promotor a sus elementos funcionales y esenciales se puede llevar a cabo in vitro mediante mutaciones de supresión por ensayo y error, o in silico mediante rutinas de búsqueda del elemento promotor. Las regiones esenciales para la actividad del promotor a menudo muestran agrupaciones de ciertos elementos promotores conocidos. Tales análisis se puede realizar mediante algoritmos de ordenador disponibles tales como PLACE ("Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements"; Higo 1999), la base de datos BIOBASE "Transfac" (Biologische Datenbanken GmbH, Braunschweig; Wingender 2001) o la base de datos PlantCARE (Lescot 2002). Son especialmente preferidos los fragmentos equivalentes de polinucleótidos del promotor, que se obtienen mediante la supresión de la región que codifica la región 5' no traducida del ARNm, proveyendo de este modo únicamente la región del polinucleótido del promotor (no transcrita). La región 5' no traducida se puede determinar fácilmente mediante métodos conocidos en el arte (tales como análisis 5'-RACE). Por lo tanto, algunos de los polinucleótidos del promotor de la invención son fragmentos equivalentes de otros polinucleótidos del promotor. Los fragmentos específicos mínimos del polinucleótido del promotor de la invención incluyen, sin limitación, un polinucleótido que comprende los nucleótidos 748 a 998, o 500 a 998, o 573 a 922 de una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, y un polinucleótido que comprende los nucleótidos 400 a 609, o 260 a 609, o 200 a 609 de una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3, un polinucleótido que comprende un fragmento de al menos 50 nucleótidos consecutivos, o al menos 100 nucleótidos consecutivos, o al menos 200 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1 o 3.

45 Como se indicó anteriormente, los mutantes de supresión de los polinucleótidos del promotor de la invención también se pueden preparar aleatoriamente y luego analizados. Con esta estrategia, se preparan una serie de construcciones, cada una conteniendo un fragmento diferente del polinucleótido del promotor. Estas construcciones luego se criban por actividad. Un medio adecuado para cribar por actividad es unir un polinucleótido del promotor, que contiene un segmento del polinucleótido del promotor, a un marcador seleccionable o cribable, y aislar sólo aquellas células que expresen el gen marcador. De esta manera, se identifican una cantidad de diferentes construcciones de polinucleótidos del promotor suprimidas que aún retienen la actividad deseada, o incluso mejorada. El fragmento más pequeño del polinucleótido del promotor, que es necesario para la actividad, se identifica por lo tanto mediante la comparación de las construcciones seleccionadas. Este fragmento del polinucleótido del promotor se puede utilizar entonces para la construcción de vectores para la expresión de un segundo polinucleótido, por ejemplo que codifica genes exógenos.

Los medios para crear mutaciones o supresiones en un polinucleótido, por ejemplo un polinucleótido del promotor, son conocidos por los expertos en el arte y se divulgan, por ejemplo, en la patente estadounidense No. 6.583.338, que se incorpora aquí en su totalidad por referencia. Un ejemplo de una variante de secuencia reguladora es un polinucleótido del promotor formado por una o más supresiones de un polinucleótido del promotor más grande. La

porción 5' de un polipéptido del promotor hasta la caja TATA cerca del sitio de inicio de transcripción a veces puede ser suprimida sin eliminar la actividad del polinucleótido del promotor, como se describe en Zhu et al., (1995) The Plant Cell 7: 1681 - 1689. Una forma habitual para remover parte de un polinucleótido es utilizar una exonucleasa en combinación con amplificación del ADN para producir supresiones anidadas unidireccionales de clones de ADN bicatenario. Un kit comercial para este propósito se vende con el nombre comercial Exo-Size™ (New England Biolabs, Beverly, Mass.). Las variantes biológicamente activas también incluyen, por ejemplo, los polinucleótidos nativos del promotor de la invención que tienen una o más sustituciones, supresiones o inserciones de nucleótidos.

Los derivados y las variantes también incluyen homólogos, parálogos y ortólogos de otras especies, tales como, pero sin limitarse a, bacterias, hongos y plantas. "Homólogo" es un término genérico que se utiliza en el arte para indicar una secuencia de polinucleótidos o de polipéptidos que tienen un alto grado de relación de secuencia con una secuencia de referencia. Dicha relación se puede cuantificar determinando el grado de identidad y/o similitud entre las dos secuencias como se definió aquí anteriormente. Este término genérico incluye los términos "ortólogo" y "parálogo". "Parálogo" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que dentro de la misma especie es funcionalmente similar. "Ortólogo" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que es el equivalente funcional del polinucleótido o polipéptido en otras especies. Un gen ortólogo significa preferentemente un gen que codifica una proteína ortóloga. Más específicamente, el término "ortólogo" denota un polipéptido o una proteína obtenidos de una especie que es la contraparte funcional de un polipéptido o una proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la especiación.

Una de las formas de realización abarca variantes alélicas de un polinucleótido capaz de mediar la expresión preferida de la raíz y/o inducible por patógenos seleccionada del grupo que consiste en a) un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, o 3; b) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 748 a 998, o los nucleótidos 500 a 998, o los nucleótidos 573 a 922 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1; c) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 400 a 609, o los nucleótidos 260 a 609, o los nucleótidos 200 a 609 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3; d) un polinucleótido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c); e) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas a cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c); y e) un polinucleótido que comprende un fragmento de al menos 50 nucleótidos consecutivos, o al menos 100 nucleótidos consecutivos, o al menos 200 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, o 3. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "variante alélica" hace referencia a un polinucleótido que contiene polimorfismos que conducen a cambios en los nucleótidos del polinucleótido y que existen dentro de una población de origen natural (por ejemplo, una especie o variedad vegetal). El término "variante alélica" también hace referencia a un polinucleótido que contiene polimorfismos que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de una proteína codificada por el nucleótido y que existen dentro de una población de origen natural (por ejemplo, en una especie o variedad vegetal). Tales variaciones alélicas naturales generalmente pueden dar como resultado una variación de 1 - 5% en un polinucleótido, o una variación de 1 - 5% en la proteína codificada. Las variantes alélicas se pueden identificar por secuenciación del polinucleótido de interés en una cantidad de plantas diferentes, lo cual se puede llevar a cabo fácilmente mediante el uso, por ejemplo, de sondas de hibridación para identificar el mismo polinucleótido del promotor, gen o locus genético en esas plantas. Todas y cada una de dichas variaciones del ácido nucleico en un polinucleótido que son el resultado de una variación alélica natural y no alteran la actividad funcional del polinucleótido, y todos y cada uno de dichos polimorfismos o variaciones de aminoácidos de una proteína que son el resultado de una variación alélica natural y no alteran la actividad funcional de la proteína, se pretende que estén incluidas dentro del alcance de la invención. Las variantes alélicas o los ortólogos de un gen pueden ser usados para clonar variantes de los polinucleótidos del promotor de la invención.

Se describe que el polinucleótido del promotor de la invención se puede obtener a partir de un fragmento genómico que comprende un polinucleótido del promotor que es al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% idéntico a la secuencia como se describe en la SEQ ID NO: 1, 2 o 3; o un polinucleótido que comprende los nucleótidos 748 a 998, o los nucleótidos 500 a 998, o los nucleótidos 573 a 922 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1; o un polinucleótido que comprende los nucleótidos 1637 a 1986 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 2; o un polinucleótido que comprende los nucleótidos 400 a 609, o los nucleótidos 260 a 609, o los nucleótidos 200 a 609 de un polinucleótido que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3, que está funcionalmente enlazada a un polinucleótido que codifica para una secuencia de polipéptidos, que es al menos 80% a 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idéntica o es 100% idéntica a una secuencia como la descrita por la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7. Preferiblemente, el fragmento genómico es un fragmento genómico de una planta. Dicha planta puede ser cualquier planta, por ejemplo, pero sin limitarse a, una planta monocotiledónea o dicotiledónea, preferentemente proviene de una planta dicotiledónea, más preferentemente es de una planta que pertenece a la familia Brassicaceae o Fabaceae. Preferiblemente es de una planta que pertenece al género Arabidopsis o Glycine, más preferiblemente es de Arabidopsis thaliana o Glycine max. Por lo tanto, el polinucleótido del promotor del fragmento genómico media la expresión específica de la raíz y/o inducible por nemátodos de la secuencia de polipéptidos, que es al menos 80% a 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idéntica o es 100% idéntica a una secuencia como se describe en la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID

- NO: 7. Preferentemente, la secuencia de polipéptidos, que es al menos 80% a 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idéntica o es 100% idéntica a una secuencia como la descrita por la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7, es inducida en las raíces de una planta expuesta a un estímulo de nemátodos. Preferiblemente, la distancia entre el polinucleótido del promotor y el polinucleótido ligado funcionalmente que codifica para una secuencia de polipéptidos, que es al menos 80% a 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idéntica o es 100% idéntica a una secuencia como la descrita por la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7, no es más larga de 3000 pb, 2000 pb, 1000 pb, más preferentemente no más larga de 900 pb, 800 pb, 700 pb, 600 pb e incluso más preferiblemente no más de 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb, 100 pb, 50 pb o 0 pb.
- 5
- 10 En una forma de realización adicional, el polinucleótido del promotor de la invención es inducido en las raíces de una planta expuesta a un estímulo por nemátodos. Un estímulo por nemátodos puede tener lugar cuando la planta es infectada o se encuentra en el proceso ser infectada por nemátodos que parasitan las plantas. Un polinucleótido del promotor que media la expresión en respuesta a un estímulo por nemátodos se denomina también un polinucleótido del promotor inducible por nemátodos. El término expresión preferida de la raíz con respecto a promotores, polinucleótidos del promotor, polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de la invención significa expresión principalmente en tejido radicular, en particular en tejido vascular radicular. La expresión principalmente en tejido radicular significa que la cantidad de ARNm producida bajo el control del polinucleótido del promotor de la invención es al menos 10 veces, 50 veces, 100 veces o 200 veces superior en una cantidad en particular de tejido radicular en comparación con la cantidad de ARNm producida en la misma cantidad de otro tejido, por ejemplo, tejido de hojas, tallos o flores.
- 15
- 20 El término expresión preferida de la raíz con respecto a promotores, polinucleótidos del promotor, polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de la invención significa expresión principalmente en tejido radicular, en particular en tejido vascular radicular. La expresión principalmente en tejido radicular significa que la cantidad de ARNm producida bajo el control del polinucleótido del promotor de la invención es al menos 10 veces, 50 veces, 100 veces o 200 veces superior en una cantidad en particular de tejido radicular en comparación con la cantidad de ARNm producida en la misma cantidad de otro tejido, por ejemplo, tejido de hojas, tallos o flores. En el caso de plantas de la familia de Fabaceae, también puede hacer referencia a la expresión en nódulos radiculares. En una forma de realización adicional, el promotor es inducido en nódulos radiculares de una planta Fabaceae, por ejemplo, en nódulos radiculares de *Glycine max*.
- 25
- 30 El término "resistencia a los nemátodos" tal como se utiliza en la presente invención hace referencia a la habilidad de una planta para evitar la infección por nemátodos, para matar nemátodos, o para dificultar, reducir o detener el desarrollo, el crecimiento o la multiplicación de nemátodos. Esto se puede lograr por un proceso activo, por ejemplo, mediante la producción de una sustancia perjudicial para el nemátodo, o por medio de un proceso pasivo, como el que tiene un valor nutricional reducido para el nemátodo o no desarrollar estructuras inducidas por el nemátodo, por ejemplo, células gigantes o sincitiales. El nivel de resistencia a los nemátodos por parte de una planta se puede determinar de varias maneras, por ejemplo, contando los nemátodos que son capaces de establecer parasitismo en esa planta, o midiendo el tiempo de desarrollo de los nemátodos, la proporción entre nemátodos macho y hembra o la cantidad producida de huevos de nemátodo.
- 35
- 40 La invención también está incluida en casetes de expresión que comprenden los polinucleótidos del promotor de la invención. Por "casete de expresión" en este contexto se entiende de manera amplia que comprende todas las secuencias contenidas en el casete que pueden influir en la transcripción de un ácido nucleico de interés y, si corresponde, su traducción. Además de los polinucleótidos del promotor de la invención, el casete de expresión de la invención también puede comprender elementos reguladores que mejoran la función de los polinucleótidos del promotor, elementos genéticos que permiten la transcripción y/o la traducción en organismos procariontes y/o eucariontes, y elementos reguladores secuencia abajo (en dirección 3') tales como una secuencia de terminación de la transcripción y una secuencia de poliadenilación. Los diferentes componentes del casete de expresión de la invención están ligados operativa y secuencialmente en forma conjunta. Por lo tanto, un casete de expresión de la invención puede incluir un promotor que comprende un polinucleótido del promotor, capaz de mediar la expresión preferida de la raíz y/o inducible por nemátodos, en donde el polinucleótido del promotor se selecciona del grupo de polinucleótidos que consiste de a) un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, o 3; b) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 748 a 998, o los nucleótidos 500 a 998, o los nucleótidos 573 a 922 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1; c) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 400 a 609, o los nucleótidos 260 a 609, o los nucleótidos 200 a 609 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3; d) un polinucleótido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c); e) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas a cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c); y e) un polinucleótido que comprende un fragmento de al menos 50 nucleótidos consecutivos, o al menos 100 nucleótidos consecutivos, o al menos 200 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1, 2 o 3 describe es un polinucleótido obtenido o que puede ser obtenido de un fragmento genómico, que comprende un polinucleótido del promotor que es al menos 30% idéntico a cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c), y que comprende un polinucleótido que codifica para una secuencia de polipéptidos, que es al menos 80%
- 55
- 60

- 5 idéntica a una secuencia como se describe en la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7, y que está funcionalmente enlazada al polinucleótido del promotor que es al menos 30% idéntico a cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c), o un polinucleótido que es un fragmento equivalente de cualquier polinucleótido de a) hasta f). En una forma de realización adicional, el promotor es inducido en las raíces de una planta infectada por nemátodos que parasitan las plantas.
- 10 Los elementos genéticos específicos que pueden ser opcionalmente incluidos en el casete de expresión de la invención incluyen, sin limitación, orígenes de replicación para permitir la replicación en bacterias, por ejemplo, la región ORI de pBR322 o el ori P15A; o elementos necesarios para la transferencia del T-ADN de *Agrobacterium*, tal como, por ejemplo, los bordes izquierdo y/o derecho del T-ADN. Otros componentes del casete de expresión de la invención pueden incluir, sin limitación, elementos reguladores adicionales tales como, por ejemplo, reforzadores, intrones, polienlazadores, sitios de clonación múltiple, operadores, sitios de enlazamiento de represores, sitios de enlazamiento de factores de transcripción y similares. Los ejemplos de reforzadores incluyen elementos del promotor 35S del CaMV, genes para la octopina sintetasa (Ellis et al., 1987), el gen para la actina I del arroz, el gen para la alcohol deshidrogenasa del maíz (Callis 1987), el gen para shrunken I del maíz (Vasil 1989), el elemento TMV Omega (Gallie 1989) y promotores de eucariontes no vegetales (por ejemplo, levadura; Ma 1988). Los ejemplos de secuencias de intrones de las plantas incluyen a los intrones de Adh1, bronce 1, actina 1, actina 2 (WO 00/760067) o el intrón de la sacarosa sintetasa; véase: *The Maize Handbook*, capítulo 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994).
- 20 Las secuencias líderes virales también pueden mejorar la transcripción de los ácidos nucleicos de interés mediante el casete de expresión de la invención. Por ejemplo, se ha demostrado que las secuencias líderes del virus del mosaico del tabaco (TMV por sus siglas en inglés), del virus moteado clorótico del maíz (MCMV por sus siglas en inglés) y del virus mosaico de la alfalfa (AMV por sus siglas en inglés) son efectivas para mejorar la expresión. Otros líderes conocidos en el arte incluyen pero no se limitan a: líderes de Picornavirus, por ejemplo, (líder del virus de la Encefalomiocarditis (EMCV por sus siglas en inglés); líderes de Potivirus, líder del virus jaspeado del tabaco (TEV por sus siglas en inglés); líder del MDMV (virus del mosaico enano del maíz); líder de proteína que enlaza (BiP) la cadena pesada de inmunoglobulina humana, líder no traducido del ARNm de la proteína de recubrimiento del virus del mosaico de la alfalfa (AMV ARN 4).
- 25 El casete de expresión de la invención también comprende un elemento de terminación de la transcripción o una señal de poliadenilación. Los ejemplos de elementos de terminación de la transcripción incluyen aquellos del gen para la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan 1983), el terminador para el transcrito T7 del gen para la octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* y el extremo 3' de los genes I o II del inhibidor de proteasa de la patata o del tomate.
- 30 Un segundo polinucleótido que es transcrito en ARN y, opcionalmente, expresado como una proteína, se inserta en el casete de expresión de la invención para transformación en un organismo. De acuerdo con la invención, el segundo polinucleótido se coloca secuencia abajo (es decir, en dirección 3') del polinucleótido del promotor de la invención y secuencia arriba de los elementos de terminación de la transcripción, en un enlace covalente con aquellos. Preferiblemente, la distancia entre la segunda secuencia de ácido nucleico y el polinucleótido del promotor de la invención no es de más de 200 pares de bases, más preferiblemente no más de 100 pares de bases, lo más preferible no más de 50 pares de bases.
- 35 Un casete de expresión de la invención también se puede ensamblar mediante la inserción de un polinucleótido del promotor de la invención en el genoma de la planta. Tal inserción dará como resultado un enlazamiento operable a una secuencia de ácido nucleico de interés nativa para el genoma. Tales inserciones permiten que el ácido nucleico de interés se exprese o sobreexpresen preferencialmente en tejido radicular, después de la inducción por nemátodos, como resultado de las propiedades que regulan la transcripción del polinucleótido del promotor de la invención. La inserción puede ser dirigida o aleatoria. Preferiblemente, la inserción es dirigida y llevada a cabo, por ejemplo, mediante recombinación homóloga. Por medio de este procedimiento, se puede reemplazar un promotor natural, en forma total o parcial, por el polinucleótido del promotor de la invención, modificando de este modo el perfil de expresión de un gen endógeno.
- 40 El casete de expresión de la invención se puede insertar en un vector recombinante, plásmido, cósmido, YAC (cromosoma artificial de levadura), BAC (cromosoma artificial bacteriano), o cualquier otro vector adecuado para la transformación en una célula huésped. Las células huésped preferidas son células bacterianas, en particular células bacterianas que se utilizan para la clonación o el almacenamiento de polinucleótidos o que se utilizan para la transformación de células vegetales, tales como, pero sin limitarse a, células de *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*, y células vegetales. Cuando la célula huésped es una célula vegetal, el vector o casete de expresión puede llegar a insertarse en el genoma de la célula vegetal transformada.
- 45 Alternativamente, el vector o casete de expresión puede mantenerse de forma extra cromosómica. El vector o casete de expresión de la invención puede estar presente en el núcleo, cloroplasto, mitocondria y/o plástido de las células de la planta. Preferentemente, el vector o casete de expresión de la invención se inserta en el ADN cromosómico del núcleo de la célula vegetal.
- 50
- 55

El casete de expresión de la invención se puede transformar en una planta para proveer una planta transgénica que comprende uno o más polinucleótidos en asociación operativa con un polinucleótido del promotor de la invención. El casete de expresión puede comprender cualquier nucleótido del promotor de la invención y puede comprender o no comprender un segundo polinucleótido. En una forma de realización, la planta transgénica contiene un promotor que comprende un polinucleótido del promotor como se expresa en la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 3, un fragmento mínimo de polinucleótido del promotor de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento mínimo de polinucleótido del promotor mínimo de la SEQ ID NO: 3. Alternativamente, la planta transgénica de la invención comprende un polinucleótido del promotor capaz de mediar la expresión preferida de la raíz y/o inducible por nemátodos, que hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido del promotor que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 3, un fragmento mínimo de polinucleótido del promotor de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento mínimo de polinucleótido del promotor de la SEQ ID NO: 3. Además, la planta transgénica de la invención comprende un polinucleótido del promotor capaz de mediar la expresión preferida de la raíz y/o inducible por nemátodos que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 3, o un fragmento mínimo del promotor de la SEQ ID NO: 1, un fragmento mínimo del promotor de la SEQ ID NO: 3.

Las plantas transgénicas de la invención se elaboran mediante métodos de transformación conocidos por los expertos en el arte de la biotecnología vegetal. Puede utilizarse cualquier método para transformar el vector de expresión recombinante en células vegetales para obtener las plantas transgénicas de la invención. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped, incluso células vegetales, pueden encontrarse, por ejemplo, en el documento WO2006/024509 (PCT/EP2005/009366; USSN60/6060789) y en Sambrook et al., véase más arriba, y en otros manuales de laboratorio tales como *Methods in Molecular Biology*, 1995, Vol. 44, *Agrobacterium protocols*, Ed: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

También se divulgan métodos generales para transformar plantas dicotiledóneas, por ejemplo, en las patentes estadounidenses Nos. 4.940.838; 5.464.763 y similares. Los métodos para transformar plantas dicotiledóneas específicas, por ejemplo, algodón, se exponen en las patentes estadounidenses Nos. 5.004.863; 5.159.135; y 5.846.797. Los métodos para la transformación de la soja se exponen en las patentes estadounidenses Nos. 4.992.375; 5.416.011; 5.569.834; 5.824.877; 6.384.301 y en EP 030174981. Otros métodos para la transformación de plantas se divulgan, por ejemplo, en las patentes estadounidenses Nos. 4.945.050; 5.188.958; 5.596.131; 5.981.840 y similares.

El término "planta" tal como se utiliza en la presente invención, según el contexto se puede interpretar en referencia a plantas completas, células de plantas, órganos de plantas, semillas cosechadas y la progenie de éstas. La palabra "planta" también hace referencia a cualquier planta, en particular, a plantas de semillas, y puede incluir, sin limitarse a, plantas de cultivo. Las partes de plantas incluyen, pero no se limitan a, tallos, raíces, brotes, frutos, óvulos, estambres, hojas, embriones, regiones meristemáticas, tejido calloso, gametofitos, esporofitos, polen, microesporas, hipocotiledones, cotiledones, anteras, sépalos, pétalos, polen, semillas no cosechadas y similares. El término "semillas cosechadas" hace referencia a semillas que se remueven de la planta que produce las semillas, mientras que el término "semillas no cosechadas" hace referencia a semillas que aún se encuentran conectadas a la planta que produce las semillas, por ejemplo, que están en estado de desarrollo o maduración. La planta puede ser monocotiledónea o dicotiledónea. La planta puede ser de un género seleccionado del grupo que consiste de maíz, trigo, cebada, sorgo, centeno, triticale, arroz, caña de azúcar, árboles cítricos, piña, coco, banana, café, té, tabaco, girasol, arveja, alfalfa, soja, zanahoria, apio, tomate, patata, algodón, tabaco, berenjena, pimiento, colza oleaginosa, canola, remolacha, repollo, coliflor, brócoli, lechuga, Lotus sp., Medicago truncatula, pasto perenne, ballico y Arabidopsis thaliana. En una forma de realización adicional, la planta es de un género seleccionado del grupo que consiste en árboles cítricos, piña, café, té, tabaco, girasol, arveja, alfalfa, soja, zanahoria, apio, tomate, patata, algodón, tabaco, berenjena, pimiento, colza oleaginosa, canola, remolacha, repollo, coliflor, brócoli, lechuga, Lotus sp., Medicago truncatula y Arabidopsis thaliana. En una forma de realización adicional, la planta es de un género seleccionado del grupo que consiste en tabaco, girasol, arveja, alfalfa, soja, tomate, patata, algodón, tabaco, berenjena, pimiento, colza oleaginosa, canola, remolacha, repollo, coliflor, brócoli, lechuga, Lotus sp., Medicago truncatula y Arabidopsis thaliana. En una forma de realización adicional, la planta es de un género seleccionado del grupo que consiste en maíz, trigo, cebada, sorgo, centeno, triticale, arroz, caña de azúcar, piña, coco, banana, pasto perenne y ballico.

Las plantas transgénicas de la invención pueden cruzarse con plantas transgénicas similares o con plantas transgénicas que carecen de los polinucleótidos del promotor de la invención o del polinucleótido del promotor de la invención y del segundo polinucleótido, o con plantas no transgénicas, usando métodos conocidos para fitomejoramiento de plantas, para preparar semillas. Además, la planta transgénica de la presente invención puede

5 comprender y/o ser cruzada con otra planta transgénica que comprende, uno o más genes diferentes de interés operativamente enlazados a un polinucleótido del promotor de la presente invención o a otro promotor, creando de esta forma una "acumulación" de transgenes en la planta y/o en su progenie. Se planta luego la semilla para obtener una planta transgénica fértil cruzada que comprende al ácido nucleico de interés y los polinucleótidos del promotor de la invención. La planta transgénica fértil cruzada puede tener el casete de expresión particular heredado a través del progenitor hembra o a través del progenitor macho. La segunda planta puede ser una planta endogámica. La planta transgénica fértil cruzada puede ser un híbrido. También se incluyen en la presente invención semillas de cualquiera de estas plantas transgénicas fértiles cruzadas. Las semillas de la presente invención pueden ser cosechadas de plantas transgénicas fértiles y se las puede utilizar para desarrollar generaciones de progenie de plantas transformadas de esta invención, incluso líneas de plantas híbridas que comprenden la construcción de ADN.

15 La "acumulación de genes" también puede lograrse mediante la transferencia de dos o más genes al núcleo de la célula mediante transformación de la planta. Pueden introducirse múltiples genes en el núcleo de la célula durante la transformación, ya sea de forma secuencial o al mismo tiempo. Puede reducirse la expresión de múltiples genes en plantas o especies de patógenos objetivo mediante mecanismos de silenciamiento génico, específicamente ARNi, mediante el uso de un único transgén que dirige múltiples secuencias parciales enlazadas de interés. Los múltiples genes acumulados, bajo el control de promotores individuales, también pueden ser sobreexpresados para lograr un único fenotipo deseado o múltiples fenotipos deseados. Las construcciones que contienen acumulación de genes tanto de genes sobreexpresados como de objetivos silenciados también pueden introducirse en plantas que producen un único fenotipo o múltiples fenotipos de importancia agronómica. En ciertas formas de realización, las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención pueden acumularse con cualquier combinación de secuencias de polinucleótidos de interés para crear los fenotipos deseados. Las combinaciones pueden producir plantas con una variedad de combinaciones de rasgos, incluyendo pero sin limitarse a resistencia a enfermedades, tolerancia a herbicidas, mejora del rendimiento, tolerancia al frío y a la sequía. Estas combinaciones acumuladas se pueden crear mediante cualquier método, incluyendo pero sin limitarse a fitomejoramiento cruzado de plantas mediante métodos convencionales o mediante transformación genética. Si los rasgos se acumulan mediante transformación genética, las secuencias de polinucleótidos de interés se pueden combinar de forma secuencial o simultánea en cualquier orden. Por ejemplo, si se deben introducir dos genes, las dos secuencias pueden estar contenidas en casetes de transformación separados o en el mismo casete de transformación. La expresión de las secuencias puede ser dirigida por el mismo promotor o por distintos promotores.

20 La invención además comprende un cultivo que incluye una pluralidad de las plantas transgénicas de la invención, plantadas en forma conjunta en un campo para fines agrícolas.

35 Las plantas transgénicas de la invención se pueden utilizar en un método para controlar una infestación por nemátodos que parasitan las plantas en un cultivo, que comprende la etapa de cultivar dicho cultivo a partir de semillas que comprenden un casete de expresión que contiene un polinucleótido del promotor de la planta de la invención en asociación operativa con un segundo polinucleótido que codifica un agente que interrumpe el metabolismo, el crecimiento y/o la reproducción de dicho nemátodo que parasita la planta, que mejora la tolerancia de la planta a dicho nemátodo que la parasita, o que es tóxico para dicho nemátodo que parasita la planta, en donde el casete de expresión se encuentra integrado en forma estable en los genomas de las células de la planta, las plantas y/o las semillas. Tales agentes incluyen, sin limitación, un ARN bicatenario que es sustancialmente idéntico a un gen objetivo de un nemátodo que parasita la planta que es esencial para la supervivencia, metamorfosis o reproducción del nemátodo; un ARN bicatenario que es sustancialmente idéntico a un gen de la planta necesario para mantener un sitio de alimentación del nemátodo; un ARN antisentido, un ARNsi, un ARNm o su precursor, una proteína que interfiere con el metabolismo, la supervivencia, metamorfosis o reproducción del nemátodo, una toxina microbiana, una toxina derivada de un insecto, que interfiere con el metabolismo, supervivencia, metamorfosis o la reproducción del nemátodo y similares.

40 El promotor de la presente invención comprende un polinucleótido aislado del promotor, capaz de mediar la expresión específica de la raíz y/o inducible por nemátodos, en donde el polinucleótido del promotor se selecciona del grupo de polinucleótidos que consiste de:

- 50 a) un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1 o 3;
- b) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 748 a 998, o los nucleótidos 500 a 998, o los nucleótidos 573 a 922 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1;
- c) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 400 a 609, o los nucleótidos 260 a 609, o los nucleótidos 200 a 609 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;
- 55 d) un polinucleótido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c);

e) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas a cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c);

f) un polinucleótido que comprende un fragmento de al menos 50 nucleótidos consecutivos, o al menos 100 nucleótidos consecutivos, o al menos 200 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1 o 3.

5 En una forma de realización adicional, dicho ácido nucleico comprende los nucleótidos 748 a 998, o los nucleótidos 500 a 998, o los nucleótidos 573 a 922 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1. En una forma de realización adicional, dicho ácido nucleico tiene al menos 70% de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, un polinucleótido que comprende los nucleótidos 748 a 998 de la SEQ ID NO: 1, un polinucleótido que comprende los nucleótidos 500 a 998 de la SEQ ID NO: 1, y un polinucleótido que comprende los nucleótidos 573 a 922 de la SEQ ID NO: 1. Se describe que dicho ácido nucleico comprende los nucleótidos 651 a 1000 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 2. Dicho ácido nucleico tiene al menos 70% de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 2 y un polinucleótido que comprende los nucleótidos 651 a 1000 de la SEQ ID NO: 2. En una forma de realización adicional, dicho ácido nucleico comprende los nucleótidos 400 a 609, o los nucleótidos 260 a 609, o los nucleótidos 200 a 609 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3. En una forma de realización adicional, dicho ácido nucleico tiene al menos 70% de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3, un polinucleótido que comprende los nucleótidos 400 a 609 de la SEQ ID NO: 3, un polinucleótido que comprende los nucleótidos 260 a 609 de la SEQ ID NO: 3 y un polinucleótido que comprende los nucleótidos 200 a 609 de la SEQ ID NO: 3.

Además, la invención se relaciona con un casete de expresión que comprende el promotor de la invención, que también comprende uno o más polinucleótidos operativamente enlazados. En una forma de realización adicional, dicho casete de expresión es un casete de expresión en donde dicho polinucleótido operativamente enlazado codifica un agente que interrumpe el metabolismo, el crecimiento y/o la reproducción de un nemátodo que parasita las plantas, que confiere o mejora la resistencia de la planta a un nemátodo que la parasita, o que es tóxico para un nemátodo que parasita la planta.

Además, la invención se relaciona con una planta transgénica transformada con un casete de expresión, en donde el casete de expresión comprende un ácido nucleico aislado seleccionado del grupo que consiste de: a) un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1 o 3; b) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 748 a 998, o los nucleótidos 500 a 998, o los nucleótidos 573 a 922 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1; c) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 400 a 609, o los nucleótidos 260 a 609, o los nucleótidos 200 a 609 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3; d) un polinucleótido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c); e) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas a cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c); f) un polinucleótido que comprende una porción biológicamente activa de cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c); y g) un polinucleótido que comprende un fragmento de al menos 50 nucleótidos consecutivos, o al menos 100 nucleótidos consecutivos, o al menos 200 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1 o 3. En una forma de realización adicional, dicha planta transgénica comprende un casete de expresión que comprende uno o más polinucleótidos operativamente enlazados al ácido nucleico. En una forma de realización adicional, dicha planta transgénica es seleccionada del grupo que consiste de maíz, trigo, cebada, sorgo, centeno, triticale, arroz, caña de azúcar, árboles cítricos, piña, coco, banana, café, té, tabaco, girasol, arveja, alfalfa, soja, zanahoria, apio, tomate, patata, algodón, tabaco, berenjena, pimiento, colza oleaginosa, canola, remolacha, repollo, coliflor, brócoli, lechuga, Lotus sp., Medicago truncatula, pasto perenne, ballico y Arabidopsis thaliana. En una forma de realización adicional, dicha planta transgénica se transforma con un casete de expresión, en donde el casete de expresión comprende los nucleótidos 748 a 998, o los nucleótidos 500 a 998, o los nucleótidos 573 a 922 de un polinucleótido que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1. En una forma de realización adicional, dicha planta transgénica se transforma con un casete de expresión, en donde el casete de expresión comprende un ácido nucleico que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1, un polinucleótido que comprende los nucleótidos 748 a 998 de la SEQ ID NO: 1, un polinucleótido que comprende los nucleótidos 500 a 998 de la SEQ ID NO: 1, y un polinucleótido que comprende los nucleótidos 573 a 922 de la SEQ ID NO: 1. Se describe una planta transgénica que se transforma con un casete de expresión, en donde el casete de expresión comprende un ácido nucleico que comprende los nucleótidos 651 a 1000 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 2. Dicha planta transgénica se transforma con un casete de expresión, en donde el casete de expresión comprende un ácido nucleico que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 2 y un polinucleótido que comprende los nucleótidos 651 a 1000 de la SEQ ID NO: 2. En una forma de realización adicional, dicha planta transgénica se transforma con un casete de expresión, en donde el casete de expresión comprende un ácido nucleico que comprende los nucleótidos 400 a 609, o los nucleótidos 260 a 609, o los

5 nucleótidos 200 a 609 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3. En una forma de realización adicional, dicha planta transgénica se transforma con un casete de expresión, en donde el casete de expresión comprende un ácido nucleico que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3, un polinucleótido que comprende los nucleótidos 400 a 609 de la SEQ ID NO: 3, un polinucleótido que comprende los nucleótidos 260 a 609 de la SEQ ID NO: 3 y un polinucleótido que comprende los nucleótidos 200 a 609 de la SEQ ID NO: 3.

10 Además, la invención se relaciona con un método para conferir o mejorar la resistencia a los nemátodos en una planta, que comprende: a) preparar una construcción que comprende el promotor de la reivindicación 1 operativamente enlazado a uno o más polinucleótidos, b) transformar una célula de la planta con la construcción de a) en donde el promotor induce la transcripción del polinucleótido operativamente enlazado en la célula de la planta en respuesta a un estímulo por parte del nemátodo; y c) regenerar la célula vegetal transformada para producir una planta transgénica que tenga resistencia a los nemátodos o mayor resistencia a los nemátodos. En una forma de realización adicional, dicho método es un método, en donde el ácido nucleico operativamente enlazado codifica un agente que interrumpe el metabolismo, el crecimiento y/o la reproducción de un nemátodo que parasita la planta, que confiere o mejora la resistencia de la planta a un nemátodo que la parasita, o que es tóxico para un nemátodo que parasita la planta. En una forma de realización adicional, dicho método es un método, en donde el promotor es un promotor preferido de la raíz y/o inducible por nemátodos.

20 Además, la invención se relaciona con un método para conferir o mejorar la resistencia de la planta a los nemátodos, que comprende: a) preparar una construcción que comprende un primer ácido nucleico que se encuentra en complementación antisentido con una segunda secuencia de ácido nucleico que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 1, b) transformar una célula de la planta con la construcción de a) en donde la primera secuencia de nucleótidos interrumpe o reduce la expresión de la función reguladora de la segunda secuencia de ácido nucleico; y c) regenerar la célula vegetal transformada para producir una planta transgénica que tenga resistencia a los nemátodos o mayor resistencia a los nemátodos. En una forma de realización adicional, dicho método es un método, en donde el promotor es un promotor preferido de la raíz o inducible por nemátodos.

Los siguientes ejemplos no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones de la invención, sino más bien ejemplificar ciertas formas de realización.

Ejemplos

30 **Ejemplo 1** Clonación del promotor del gen tipo MtN3 de soja

Escisión con láser de sincitios

35 Se germinó *Glycine max* cv. Williams 82 sobre placas de agar durante tres días y luego fue transferido a bolsas de germinación. Un día después, se inoculó cada plántula con nemátodos en segunda etapa de desarrollo juvenil (J2) de *H. Glycines* raza 3. Seis días después de la inoculación se rebanó nuevo tejido de raíz en pedazos de 1 cm de largo, se lo fijó, embebió en un criomolde, y seccionó usando métodos conocidos. Se identificaron las células sincitiales por medio de su morfología única de células de tamaño agrandado, pared celular engrosada, y citoplasma denso y se hizo una disección en amortiguador de extracción de ARN usando un microscopio PALM (P. A. L. M. Microlaser Technologies GmbH, Bernried, Alemania).

40 Se extrajo ARN celular total, amplificó, y marcó en forma fluorescente usando métodos conocidos. Como controles, se aisló ARN total tanto de raíces de control no tratadas como "sin sincitios" sometido al mismo proceso de amplificación del ARN. El ARN amplificado se hibridó con arreglos patentados de ADNc de soja. La Tabla 1 resume los datos de la expresión de acuerdo a lo medido por medio del análisis de microarreglos de ADNc para este gen a través de todas las tres muestras de células/tejido: tejidos de raíz de control de sincitios, sincitios no infectados con SCN, y no tratados. Los niveles relativos de expresión génica se muestran como intensidades de señal normalizadas (\pm desviación estándar). Como se demuestra en la Tabla 1, se identificó el clon 47116125 de ADNc de soja por ser expresado en sincitios de raíces de soja infectadas con SCN.

Tabla 1. Expresión del gen (tipo MtN3) tipo Nodulina 3 de *Medicago truncatula*

Nombre del gen	Sincitio # 1 (N)	Sincitio # 2 (N)	Sin sincitios	Raíces de control
47116125	3104 \pm 477 (4)	2117 \pm 450 (5)	99 \pm 62	191 \pm 90

(continuación)

Nombre del gen	Sincitio # 1 (N)	Sincitio # 2 (N)	Sin sincitios	Raíces de control
(N) Número de mediciones de microarreglos de ADNc				

5 Como se demuestra en la Tabla 1, se identificó el clon 47116125 de ADNc de soja por ser expresado en sincitios de raíces de soja infectadas con SCN. La Figura 4 representa la secuencia del clon 47116125 de ADNc de soja. Se determinó que la secuencia de ADNc de 47116125 (SEQ ID NO: 4) contenía la secuencia del marco de lectura abierto con base en la homología de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de Arabidopsis de los identificadores de locus At1g21460 y At5g53190 como se muestra en la Figura 5. El marco de lectura abierto de la secuencia de ADNc de 47116125 (SEQ ID NO: 4) desde las bases 23 a 787 como se muestra en la Figura 4 fue traducido y se representa por medio de la SEQ ID NO: 5 y la secuencia marcada como 47116125 en la Figura 5.

10 Para clonar la secuencia promotora de 47116125, se usó el Universal Genome Walking Kit (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, California) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para esto, se extrajo el ADN genómico de soja (*Glycine max*, Resnik) usando el Quiagen DNAeasy Plant Minikit (Qiagen). El procedimiento consistió de dos amplificaciones por PCR, usando un cebador adaptador y un cebador específico del gen para cada reacción de amplificación. Las secuencias de los cebadores usados para aislar los promotores de la invención se muestran en la
15 Figura 11. Los iniciadores específicos del gen que tienen como objetivo a 47116125 (SEQ ID NO: 4) fueron el cebador primario, 47116125GW (SEQ ID NO: 15) y el cebador anidado, 47116125GWnest (SEQ ID NO: 16). Los cebadores adaptadores usados fueron AP1 (SEQ ID NO: 13) y AP2 (SEQ ID NO: 14). Usando este protocolo, se aislaron y secuenciaron varios clones.

20 El producto clonado más largo fue identificado como pAW127 (SEQ ID NO: 8). Una alineación de secuencia de pAW127 con la secuencia de ADNc de 47116125 (SEQ ID NO: 4) indicó que este clon es casi idéntico a 47116125 como se muestra en la Figura 7. La falta de correspondencia de secuencia entre la secuencia de pAW127 y la secuencia de ADNc de 47116125 son marcadas con un asterisco en la Figura 7. La alineación reveló que pAW127 contenía una secuencia promotora de 609 pb secuencia arriba del ATG desde el nucleótido 51 hasta el 659 de la secuencia de pAW127 (véase la Figura 7). Esta alineación también reveló un codón de detención comenzando en
25 627 pb secuencia arriba del codón de inicio ATG en el mismo marco, indicando que el codón de inicio que comienza en 660 pb es el primer codón de inicio del marco de lectura abierto de la secuencia del gen para 47116125. Esta región promotora fue clonada fuera de pAW127 usando técnicas estándar de PCR y los cebadores 47116125prF (SEQ ID NO: 17) y 47116125prR (SEQ ID NO: 18). 47116125prF y 47116125prR amplificaron el fragmento del promotor de 609 pb de pAW127 que contenía los sitios de la enzima de restricción PstI y Ascl respectivamente por la
30 facilidad de la clonación direccional. El promotor de 47116125 y las secuencias de 5'UTR, sin los sitios de restricción usados para la clonación, se muestran como la SEQ ID NO: 3. La secuencia de nucleótidos 1 - 609 representa la secuencia completa del promotor con la región promotora central que abarca los nucleótidos 260 - 609. La señal de TATA putativa abarca los nucleótidos 513 a 519 y la secuencia líder putativa no traducida 5' del ARNm de los nucleótidos 553 - 609.

35 **Ejemplo 2** Clonación de polinucleótidos del promotor del gen tipo MtN3 de Arabidopsis

Las regiones del polinucleótido del promotor de los genes At1g21460 y At5g53190 de Arabidopsis se seleccionaron en base en la similitud de sus secuencias codificadas de aminoácidos (SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, respectivamente) con la secuencia de aminoácidos del clon 47116125 de ADNc de la soja (SEQ ID NO: 5) como se muestra en la Figura 5. Se extrajo el ADN genómico de Arabidopsis (ecotipo Columbia) utilizando el Qiagen
40 DNAeasy Plant Minikit (Qiagen, Valencia, California, EE. UU.). Las regiones de ADN genómico de 998 pb (SEQ ID NO: 1) y 1.986 pb (SEQ ID NO: 2) (polinucleótidos del promotor) ubicadas directamente secuencia arriba del codón ATG que incluye la región no traducida 5' correspondiente a genes de tipo MtN3 de Arabidopsis con identificadores de locus, At1g21460 y At5g53190, respectivamente, se clonaron utilizando protocolos estándar de amplificación por PCR. Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR del polinucleótido del promotor de Arabidopsis se muestran en la Figura 11 y se diseñaron con base en la base de datos de secuencias genómicas de Arabidopsis
45 (TAIR). Las secuencias de cebadores descritas por la SEQ ID NO: 9 contienen el sitio de restricción PstI para facilitar la clonación. La secuencia del cebador descrita por la SEQ ID NO: 11 contiene el sitio de restricción PacI para facilitar la clonación. La secuencia del cebador descrita por la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 12 contienen el sitio Ascl para facilitar la clonación. Las secuencias de cebadores descritas por la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10 se utilizaron para amplificar el polinucleótido del promotor del locus At1g21460 de Arabidopsis descrito por la SEQ
50 ID NO: 1. Las secuencias de cebadores descritas por la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12 se utilizaron para amplificar el polinucleótido del promotor del locus At5g53190 de Arabidopsis descrito por la SEQ ID NO: 2, respectivamente.

El tamaño del fragmento de ADN amplificado para cada producto de la PCR se verificó mediante electroforesis estándar en gel de agarosa y se extrajo el ADN. Los fragmentos purificados se clonaron en pCR2.1 utilizando el kit de clonación TOPO TA siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen) y se secuenciaron mediante la utilización de un secuenciador automatizado Applied Biosystems 373A (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU). Los fragmentos de ADN de 998 pb y 1.986 pb que corresponden a los polinucleótidos del promotor de At1g21460 y At5g53190 se muestra en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2. Los sitios de restricción introducidos en los cebadores para facilitar la clonación no se incluyen en las secuencias.

Ejemplo 3 Construcción del vector binario para la transformación y generación de raíces vellosas transgénicas

Para evaluar la actividad de expresión del polinucleótido del promotor clonado, se clonaron fragmentos de genes correspondientes a los nucleótidos 1 a 998 de la SEQ ID NO: 1, los nucleótidos 1 a 1.986 de la SEQ ID NO: 2 y los nucleótidos 1 a 609 de la SEQ ID NO: 3 secuencia arriba de un gen reportero para GUS (gen para GUS o β -glucuronidasa bacteriana (Jefferson (1987) EMBO J. 6, 3901 - 3907) para crear los vectores binarios pWT128qcz, RCB1022 y pAW222qcz, respectivamente. El marcador seleccionable de la planta en los vectores binarios pWT128qcz y pAW222qcz es una forma resistente a herbicidas del gen para la acetohidroxi ácido sintasa (AHAS por sus siglas en inglés) de Arabidopsis thaliana (Sathasivan et al., Plant Phys. 97: 1044 - 50, 1991). Se usó como agente de selección ARSENAL (imazapir, BASF Corp., Florham Park, NJ). El marcador seleccionable de la planta en el vector binario RCB1022 es una forma resistente a herbicidas del gen para la acetohidroxi ácido sintetasa (AHAS) de Arabidopsis thaliana dirigido por el promotor constitutivo de ubiquitina del perejil (Sathasivan et al., Plant Phys. 97: 1044 - 50, 1991; Plesch, G.; Ebneith, M. Method for the stable expression of nucleic acids in transgenic plants, controlled by a parsley ubiquitin promoter. Solicitud de patente WO 03/102198 A1; 2003).

En el presente ejemplo, los vectores binarios pWT128 y pAW222qcz se transformaron en la cepa K599 de *A. rhizogenes* por electroporación. Antes de la inoculación de *A. rhizogenes*, se germinaron las semillas de *G. max* Williams 82 (susceptible al SCN), se cortaron los cotiledones y se lesionó el lado adaxial varias veces. Se inoculó una suspensión de *A. rhizogenes* en la superficie lesionada, y se incubó el cotiledón inoculado con el lado adaxial hacia arriba durante 3 días a 25°C con iluminación durante 16 horas/día. Se transfirieron luego los cotiledones a placas de MS que contenían carbenicilina (para suprimir el crecimiento de *A. rhizogenes*) y ARSENAL 1 μ M (imazapir, BASF Corporation, Florham Park, NJ) como el agente de selección. Se indujeron raíces vellosas a partir de los sitios lesionados luego de dos semanas. Las raíces resistentes a ARSENAL y que crecieron en el medio de selección se cosecharon y transfirieron a un medio de selección fresco de la misma composición y se incubaron a 25°C en la oscuridad. Dos semanas después de cosechar raíces vellosas y cultivarlas en el medio de selección, las raíces vellosas se subcultivaron en medio MS que contenía carbenicilina pero no ARSENAL.

Se generaron diversas líneas de raíces vellosas transgénicas independientes a partir de la transformación con pAW280. Aproximadamente tres semanas después del subcultivo, se inocularon las líneas de raíces vellosas transgénicas con *H. Glycines* raza 3 J2. Doce días después de la inoculación de *H. glycines* (DAI por sus siglas en inglés), se cosecharon las raíces vellosas y analizaron para determinar la actividad de β -glucuronidasa del gen para GUS, utilizando ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-glucurónico (x-Gluc). En cada período de tiempo después de la inoculación, también se tiñó una placa de control no inoculada de cada línea en solución de coloración con GUS. Luego se observaron las raíces bajo el microscopio para detectar la expresión de GUS. Para cada línea transgénica, se observaron 10 sincitios escogidos aleatoriamente y se les dio un puntaje según la intensidad de la expresión de GUS. Se utilizó el siguiente índice de puntuación: "-" para ausencia de coloración, "+" para coloración débil, "++" para coloración intensa. Se utilizó un promedio redondeado de 10 recuentos para determinar el nivel de expresión de GUS en los sincitios para esa línea. Además, también se registró el nivel de expresión de GUS en las mismas líneas para otros tejidos radiculares tales como callo, extremo de raíz, vasculatura, cortical y primordial usando el mismo índice de puntuación para GUS de "-" para ausencia de coloración, "-/+ " indica que hubo aproximadamente un 25% de las líneas testeadas que mostraron coloración vascular de GUS en menos del 25% de los tejidos de la raíz observados, "+" para coloración débil, "++" para coloración intensa. Los resultados para las líneas transformadas con pWT128 y pAW222qcz se presentan en la Figura 8.

El resultado de la coloración con GUS indica que, para la mayoría de las líneas evaluadas, el fragmento del polinucleótido del promotor en pWT128 mostró expresión de GUS de intermedia a intensa en los sincitios y el tejido vascular radicular a los 12 DAI. Por el contrario, no se detectó o se detectó levemente expresión de GUS en otras partes de la raíz, tales como los extremos de la raíz y la corteza de la raíz. Además, el resultado de la coloración con GUS indica que para la mayoría de las líneas evaluadas, el fragmento del polinucleótido del promotor en pAW222qcz mostró una expresión intensa de GUS en los sincitios y el tejido vascular radicular a los 12 DAI. Por el contrario, no se detectó o se detectó levemente expresión de GUS en otras partes de la raíz, tales como los extremos de la raíz y la corteza de la raíz.

Ejemplo 4 Supresiones de clonación de los polinucleótidos del promotor At1g21460 (SEQ ID NO: 1) y p-47116125 (SEQ ID NO: 3)

A fin de definir en forma más precisa la región del polinucleótido del promotor de At1g21460 (SEQ ID NO: 1) y p-

47116125 (SEQ ID NO: 3), se evaluaron fragmentos más cortos de la secuencia en dirección 5'. Se extrajo ADN plasmídico de pWT128 y pAW222qcz de *E. coli* usando el kit Qiagen Plasmid miniprep (Qiagen). Los fragmentos de supresión del polinucleótido del promotor de 499 pb y 251 pb del polinucleótido del promotor del locus At1g21460 de *A. thaliana* (SEQ ID NO: 1) contenidos en pWT128 y los fragmentos de supresión del polinucleótido del promotor de 410 pb y 210 pb del clon p-47116125 de ADNc de *Glycine max* (SEQ ID NO: 3) contenidos en pAW222qcz se amplificaron mediante el protocolo de amplificación estándar por PCR. Para esto, se utilizaron aproximadamente 0,1 µg de ADN plasmídico pWT128 o pAW222qcz como molde de ADN en la reacción PCR. Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR de los polinucleótidos del promotor de *Arabidopsis* se muestran en la Figura 11 y se diseñaron con base en secuencia de polinucleótidos del promotor del polinucleótido del promotor del locus At1g21460 de *A. thaliana* (SEQ ID NO: 1) contenida en pWT128 o el polinucleótido del promotor de p-47116125 de *Glycine max* (SEQ ID NO: 3) contenido en pAW222qcz. Las secuencias de cebadores descritas por la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 23 contenían el sitio de restricción PstI para facilitar la clonación. La secuencia del cebador descrita en la SEQ ID NO: 21 hibrida con el extremo 3' del polinucleótido del promotor At1g21460 y con el sitio Ascl en pWT128 de tal manera que el sitio Ascl estará contenido en el fragmento amplificado para facilitar la clonación. La secuencia del cebador descrita por la SEQ ID NO: 24 hibrida con el extremo 3' del polinucleótido del promotor p-47116125 secuencia arriba del sitio Ascl en pAW222qcz de tal manera que un sitio AatII estará contenido en el fragmento amplificado para facilitar la clonación. Las secuencias de cebadores descritas por la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 21 se utilizaron para amplificar la región de supresión del polinucleótido del promotor de 499 pb del polinucleótido del promotor del locus At1g21460 de *Arabidopsis* contenido en pWT128. Las secuencias de cebadores descritas por la SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO: 21 se utilizaron para amplificar la región de supresión del polinucleótido del promotor de 251 pb del polinucleótido del promotor del locus At1g21460 de *Arabidopsis* contenido en pWT128. Las secuencias de cebadores descritas por la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 24 se utilizaron para amplificar la región de supresión del polinucleótido del promotor de 410 pb de p-47116125 contenido en pAW222qcz. Las secuencias de cebadores descritas por la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 24 se utilizaron para amplificar la región de supresión del polinucleótido del promotor de 210 pb de p-47116125 contenida en pAW222qcz.

El tamaño del fragmento de ADN amplificado para cada producto de PCR se verificó mediante electroforesis estándar en gel de agarosa y se extrajo el ADN. Se digirieron los fragmentos purificados con PstI y Ascl para las supresiones del polinucleótido del promotor de At1g21460 amplificado de pWT128 y PstI y AatII para las supresiones del polinucleótido del promotor de p-47116125 amplificado de pAW222qcz siguiendo las instrucciones del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EE.UU.). Los fragmentos digeridos se purificaron mediante un kit de purificación Qiagen PCR (Qiagen). La región de supresión del polinucleótido del promotor de 499 pb del polinucleótido del promotor At1g21460 amplificada utilizando los cebadores de la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 21 se encuentra representada por las bases 500 a 998 de la SEQ ID NO: 1. La región de supresión del polinucleótido del promotor de 251 pb del polinucleótido del promotor de At1g21460 amplificada utilizando los cebadores de la SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO: 21 se encuentra representada por las bases 748 a 998 de la SEQ ID NO: 1. La región de supresión del polinucleótido del promotor de 410 pb del polinucleótido del promotor p-47116125 amplificada utilizando los cebadores de la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 24 se encuentra representada por las bases 200 a 609 de la SEQ ID NO: 3. La región de supresión del polinucleótido del promotor de 210 pb del polinucleótido del promotor p-47116125 amplificada utilizando los cebadores de la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 24 se encuentra representada por las bases 400 a 609 de la SEQ ID NO: 3. Los sitios de restricción introducidos en los cebadores para facilitar la clonación no se encuentran incluidos en las secuencias designadas.

Ejemplo 5 Construcción del vector binario de supresiones de los polinucleótidos de los promotores At1g21460 y p-47116125 para la transformación y generación de raíces vellosas transgénicas

Para evaluar la actividad de expresión de las supresiones del polinucleótido del promotor clonado derivado de pWT128 y pAW222qcz, se clonaron fragmentos génicos correspondientes a los nucleótidos 500 a 998 de la SEQ ID NO: 1, 748 a 998 de la SEQ ID NO: 1, 200 a 609 de la SEQ ID NO: 3 y 400 a 609 de la SEQ ID NO: 3 secuencia arriba de un gen reportero para GUS (gen para GUS o β-glucuronidasa bacteriana) para crear los vectores binarios RTJ113, RTJ114, RTJ117 y RTJ118, respectivamente. El marcador de selección de la planta en los vectores binarios era un gen mutado para AHAS de *A. thaliana* (Sathasivan et al., *Plant Phys.* 97: 1044 - 50, 1991) que confirió tolerancia al herbicida ARSENAL (imazapir, BASF Corporation, Florham Park, NJ).

En la presente ejemplo, los vectores binarios RTJ113, RTJ114, RTJ117 y RTJ 118 se transformaron en la cepa K599 de *A. rhizogenes* por electroporación. Que a su vez se utilizó para crear raíces vellosas transgénicas como se describe en el Ejemplo 3. Las raíces vellosas transgénicas se utilizaron para coloración con GUS para detectar la actividad del polinucleótido tal como se describe en el Ejemplo 3.

Para cada línea transgénica, se observaron 10 sincitios escogidos aleatoriamente y se les dio un puntaje según la intensidad de la expresión de GUS 12 días después de la infección (DAI). Se utilizó el siguiente índice de puntuación: “-” para ausencia de coloración, “+” para coloración débil, “++” para coloración intensa. Se utilizó un promedio redondeado de 10 recuentos para determinar el nivel de expresión de GUS en los sincitios para esa línea. Además, también se registró el nivel de expresión de GUS en las mismas líneas para otros tejidos radiculares tales

como callo, extremo de raíz, vasculatura, cortical y primordial usando el mismo índice de puntuación para GUS de “-” para ausencia de coloración, “+” para coloración débil, “++” para coloración intensa. Los resultados para las líneas transformadas con pWT128, RTJ113, y RTJ114 se presentan en la Figura 9. Los resultados para las líneas transformadas con pAW222qcz, RTJ117, y RTJ118 se presentan en la Figura 10.

5 Los fragmentos del polinucleótido del promotor de 499 y 251 pb del polinucleótido del promotor At1g21460 contenidos en RTJ113 y RTJ114, respectivamente, fueron capaces conferir ambos expresión inducida por nemátodos en sincitios, lo cual indica que todos los elementos reguladores requeridos que dan como resultado expresión inducida por nemátodos están incluidos en el polinucleótido del promotor de 251 pb contenido en RTJ114. Los resultados indican que existe mayor expresión de tejido vascular en los fragmentos del polinucleótido del promotor de 499 y 251 pb del promotor At1g21460 contenido en RTJ113 y RTJ114, respectivamente, en comparación con la secuencia del promotor pWT128.

10 Los fragmentos del polinucleótido del promotor de 410 y 210 pb del polinucleótido del promotor p-47116125 contenidos en RTJ117 y RTJ118, respectivamente, fueron capaces de conferir ambos expresión inducida por nemátodos en sincitios, lo cual indica que todos los elementos reguladores requeridos que dan como resultado expresión inducida por nemátodos están contenidos en el fragmento del polinucleótido del promotor de 210 pb contenido en RTJ118. Los resultados indican que existe menor expresión de tejido vascular en el fragmento del polinucleótido del promotor de 210 pb del promotor p-47116125 contenido en RTJ114 en comparación con la secuencia del promotor pAW222qcz.

Ejemplo 6 Análisis PLACE de polinucleótidos del promotor

20 Los resultados del análisis PLACE (National Institute of Agrobiological Sciences, Ibaraki, Japón) indican una caja TATA ubicada en la posición del nucleótido 830 a la posición del nucleótido 836 de la SEQ ID NO: 1 como se muestra en la Figura 1. De acuerdo con la información del sitio web TAIR, la región 5' no traducida comienza alrededor de la posición del nucleótido 923. La secuencia descrita por SEQ ID NO: 1 termina inmediatamente antes del codón de inicio ATG. La región central potencial del polinucleótido del promotor descrita por la SEQ ID NO: 1 es de la posición del nucleótido 573 a la posición del nucleótido 922.

25 Los resultados del análisis PLACE no indican una caja TATA ubicada aproximadamente dentro de 300 pb del extremo 3' de la SEQ ID NO: 2 como se muestra en la Figura 2. Se desconoce la región 5' no traducida. La secuencia descrita por SEQ ID NO: 2 termina inmediatamente antes del codón de inicio ATG. La región central potencial del polinucleótido del promotor descrita por SEQ ID NO: 2 es de la posición del nucleótido 986 a la posición del nucleótido 1637.

30 Los resultados de PLACE indican una caja TATA ubicada en la posición del nucleótido 513 a la posición del nucleótido 519 de la SEQ ID NO: 3 tal como se muestra en la Figura 3. En consecuencia, la región 5' no traducida comienza aproximadamente en la posición del nucleótido 553. La secuencia descrita por SEQ ID NO: 3 termina inmediatamente antes del codón de inicio ATG. La región central potencial del polinucleótido del promotor descrita por la SEQ ID NO: 3 es de la posición del nucleótido 260 a la posición del nucleótido 609.

Ejemplo 7 Construcción de un vector binario para generar construcciones de polinucleótidos del promotor de plantas enteras con selección BAR

40 Para evaluar la actividad de expresión de los polinucleótidos del promotor clonados representados por los nucleótidos desde la posición 250 a la 998 de la SEQ ID NO: 1, y los nucleótidos desde la posición 1 a la 609 de la SEQ ID NO: 3 en nódulos de soja después de su infección con *Bradyrhizobium japonicum* e inoculación por hongos con *Rhizoctonia solani* forma *specialis* (f. sp.) *glycines* y *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, los polinucleótidos del promotor representados por los nucleótidos desde la posición 250 a la 998 de la SEQ ID NO: 1 y los nucleótidos desde la posición 1 a la 609 de la SEQ ID NO: 3 se clonaron secuencia arriba de un gen reportero para GUS (gen para GUS u 11-glucuronidasa bacteriana) para crear los vectores binarios RTJ125 y RTJ129, respectivamente. El marcador de selección de la planta en los vectores binarios es un gen BAR (De Block, M. et. al. (1987) EMBO J.6: 2513 - 2518) dirigido por el promotor constitutivo del gen de nopalina sintasa (p-NOS, An G. et al., The Plant Cell 3: 225 - 233, 1990). Los vectores binarios RTJ125 y RTJ129 se utilizaron para generar raíces transgénicas para análisis.

Ejemplo 8 Sistema de ensayo de una planta de soja con raíces

50 Este ensayo puede encontrarse en la solicitud de patente en trámite junto con la presente USSN 60/871.258, presentada el 21 de diciembre de 2006, y por la descripción siguiente.

Se esterilizaron superficialmente semillas de soja limpias de la variedad cultivada de soja y se germinaron. Las plántulas de soja resultantes tenían hipocotiledones alargados con epicotilos visibles. Luego se prepararon los

5 explantes retirando los epicotilos y parte de los hipocotilos. Los explantes contenían uno o más cotiledones, un meristema axilar y el hipocotilo. Se retiró la cubierta de la semilla para facilitar el desarrollo del cotiledón. El extremo cortado del hipocotilo era el objetivo de la transformación/infección. Tres días antes de la inoculación, se inició un cultivo líquido durante la noche del cultivo desactivado de *Agrobacterium*, por ejemplo, la cepa K599 desactivada de *A. rhizogenes* que contenía el vector binario. Al siguiente día se esparció el cultivo sobre una placa de agar LB que contenía kanamicina como agente de selección. Se incubaron las placas a 28° C durante dos días. Se preparó una placa por cada 50 explantes para ser inoculados. Los explantes preparados se sumergieron en colonias desactivadas gruesas de *A. rhizogenes* preparadas anteriormente de tal manera que las colonias eran visibles sobre la superficie del extremo de corte. Se colocaron entonces los explantes en agar al 1% en placas de Petri para su cocultivo con luz durante 6 a 8 días. Después de la transformación y el cocultivo, se transfirieron los explantes de soja a un medio de inducción de raíces con un agente de selección, por ejemplo, S-B5-607 para la selección del gen Bar, (De Block et al., EMBO J.6: 2513 - 2518, 1987). El medio S-MS-607 contiene: 0,2X de sales MS y vitaminas B5, sacarosa al 2%, 400 mg/l de Timentina, y 3 mg/L de Glufosinato de Amonio a pH 5,8. Se mantuvieron los explantes en las mismas condiciones que en la etapa de cocultivo. Dos a tres semanas luego de la selección e inducción de raíces, se formaron raíces transformadas en los extremos cortados de los explantes. Se transfirieron los explantes al mismo medio de selección. Las raíces transgénicas proliferaron bien en el lapso de una semana en el medio y se encontraban listas para ser subcultivadas.

Ejemplo 9 Inducción del nódulo del sistema de ensayo de la planta con raíces y detección de actividad del polinucleótido del promotor en los nódulos.

20 Tal como se expone en el Ejemplo 7, los polinucleótidos del promotor de la invención se colocaron en asociación operativa con el gen reportero para GUS para determinar la actividad de expresión. La actividad de β -glucuronidasa del gen para GUS puede detectarse in planta por medio de una sustancia cromogénica tal como el ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-glucurónico (x-Gluc) en una reacción de coloración de la actividad (Jefferson, véase más arriba).

25 En el presente ejemplo, los vectores binarios RTJ125 y RTJ129 se transformaron en la cepa desactivada K599 de *A. rhizogenes* SHA017 (pSB1) mediante electroporación. Se utilizó *Agrobacterium* transformado para inducir la formación de raíces de soja mediante el protocolo indicado en el Ejemplo 8, utilizando el extremo cortado del hipocotilo como objetivo para la transformación/infección de *Agrobacterium*. Los explantes con raíces se removieron del medio de alargamiento y se lavaron las raíces con agua para retirar el exceso de medio. Los explantes enteros se transfirieron a macetas de 4 pulgadas que contenían arena húmeda. Los explantes se regaron cada 2 días con Medio de Nodulación Amortiguado (Ehrhardt et al., 1992). Luego de dos días en arena húmeda, las raíces de los explantes se inocularon con *Bradyrhizobium japonicum*.

30 Para esto, se inició un cultivo de 4ml de *Bradyrhizobium japonicum* en un medio líquido YM y se desarrolló a 28° C con agitación. El medio YM contenía por cada litro: 10 g de Manitol, 0,4 g de extracto de levadura, 1 ml de K_2HPO_4 (patrón al 10% p/v), 4 ml de KH_2PO_4 (patrón al 10% p/v), 1 ml de NaCl (patrón al 10% p/v) y 2 ml de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (patrón al 10% p/v). Se ajustó el pH a 6,8 y se esterilizó en autoclave la solución con un volumen final de 1 litro. Luego de 7 días, se transfirieron 600 microlitros del cultivo de inicio a 40 ml de medio líquido YM fresco. Se iniciaron múltiples cultivos de 40 ml. Los cultivos se desarrollaron durante 48 horas a 28° C con agitación hasta una OD600 de aproximadamente 0,2. Los cultivos de *Bradyrhizobium japonicum* se combinaron y diluyeron 6 veces con Medio de Nodulación Amortiguado. Cada maceta que contenía un explante enraizado se inoculó con aproximadamente 25 ml del cultivo diluido de *Bradyrhizobium japonicum*. Se cavaron aproximadamente 4 agujeros de alrededor de 2 pulgadas de profundidad en la arena utilizando una clavija de madera y se inoculó el cultivo diluido de *Bradyrhizobium japonicum* en los agujeros mediante el uso de una pipeta. Al comienzo del día siguiente después de la inoculación, se regaron los explantes con raíces con Medio de Nodulación Amortiguado cada 2 días.

45 Luego de 2 semanas, los explantes con raíces se retiraron de las macetas de 4 pulgadas y se lavaron las raíces con agua para eliminar la arena. Las regiones de la raíz que contenían nódulos se diseccionaron utilizando una hoja de afeitar y se las colocó en una solución colorante de GUS que contenía X-Gluc (2 mg/l) y luego se las llevó a 37° C durante 16 horas. Algunos nódulos se rebanaron a la mitad usando una cuchilla de afeitar. Se retiró la solución de coloración de GUS y se la reemplazó con una solución que contenía partes iguales de glicerol, agua y ácido acético. Luego se observaron los nódulos de las raíces para comprobar la coloración con GUS. Se observó que los polinucleótidos del promotor descritos por 250 a 998 pb de la SEQ ID NO: 1 contenidos en la construcción RTJ125 indujeron la expresión de GUS en los nódulos de la raíz. Se observó que el polinucleótido del promotor descrito por la SEQ ID NO: 3 contenido en RTJ129 indujo la expresión de GUS en los nódulos de la raíz en menor medida en algunos nódulos observados en la base del nódulo.

55 **Ejemplo 10** Detección en ensayo de planta con raíces de la actividad del polinucleótido del promotor en raíces inoculadas con hongos

Tal como se expone en el Ejemplo 7, los polinucleótidos de los promotores de la invención se colocaron en asociación operativa con el gen reportero para GUS para determinar la actividad de expresión. La actividad de la β -glucuronidasa del gen para GUS puede detectarse in planta por medio de una sustancia cromogénica tal como el

ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-glucurónico (x-Gluc) en una reacción de coloración de la actividad.

En el presente ejemplo, los vectores binarios RTJ125 y RTJ129 fueron transformados en la cepa desactivada K599 de *A. rhizogenes* SHA017 (pSB1) mediante electroporación. Se utilizó *Agrobacterium* transformado para inducir la formación de raíces de soja mediante el protocolo indicado en el Ejemplo 8.

5 Para estudiar la actividad del polinucleótido del promotor de 250 a 998 pb de la SEQ ID NO: 1 y 1 a 609 pb de la SEQ ID NO: 3 luego de su inoculación ya sea con *Rhizoctonia solana* f. sp. *glycines* o con *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, se generaron diversas líneas transgénicas independientes mediante la transformación con las construcciones RTJ125 y RTJ129, respectivamente. Las líneas de raíces subcultivadas fueron inoculadas con *Rhizoctonia Solana* f. sp. *glycines* o con *Fusarium solani* f. sp. *glycines* colocando una pequeña cantidad de hifa en forma adyacente a varias raíces utilizando pinzas. Tres días después de la inoculación (DAI), se removieron las raíces de las placas de agar y se las tiñó en solución de coloración de GUS que contenía X-Gluc (2 mg/l) a 37°C durante 16 horas. Se observaron luego las raíces bajo un microscopio para detectar la expresión de GUS.

15 Para cada línea transgénica se observaron las raíces y se registró la intensidad de la expresión de GUS tres días después de la infección (DAI). Se observó que el polinucleótido del promotor descrito por 250 a 998 pb de la SEQ ID NO: 1 contenido en la construcción RTJ125 no inducía la expresión de GUS en las raíces luego de la inoculación con *Rhizoctonia solani* f. sp. *glycines* y con *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. Se observó que el polinucleótido del promotor descrito por la SEQ ID NO: 3 contenido en la construcción RTJ129 no indujo la expresión de GUS en las raíces luego de la inoculación con *Rhizoctonia solani* f. sp. *glycines* o con *Fusarium solani* f. sp. *glycines*.

Ejemplo 11 Transformación del ensayo de la planta con raíces con RCB1022 para el análisis de coloración de GUS

20 En el presente ejemplo, el vector binario RCB1022 será transformado en la cepa de *A. rhizogenes* SHA017 desactivada mediante electroporación. El *Agrobacterium* transformado será utilizado para inducir la formación de raíces TRAP de soja mediante el protocolo expuesto en el Ejemplo 8. Se generaron múltiples líneas de raíces TRAP de soja utilizando *Agrobacterium* desactivado transformado con la construcción RCB1022. Las líneas de la raíz TRAP serán inoculadas con J2 descontaminada en la superficie de SCN raza 3 en un nivel de 2000 J2/placa. Doce días después de la inoculación (DAI), se cosecharán las raíces retirándolas de las placas de agar y se las enjuagará suavemente con cambios de agua y se las teñirá en solución colorante de GUS que contenga X-Gluc (2 mg/l) a 37° C durante 16 horas. También se teñirá una placa de control no inoculada de cada línea en solución colorante de GUS. Luego se observarán las raíces bajo un microscopio para detectar la expresión de GUS.

30 Para cada línea transgénica, se observarán 10 sincitios escogidos aleatoriamente y se les dará un puntaje según la intensidad de la expresión de GUS 12 días después de la infección (DAI). Se utilizará el siguiente índice de puntaje: “-” para ausencia de coloración, “+” para coloración débil, “++” para coloración intensa. Se utilizará un promedio redondeado de 10 recuentos para determinar el nivel de expresión de GUS en los sincitios para esa línea. Además, también se registró el nivel de expresión de GUS en las mismas líneas para otros tejidos radiculares tales como callo, extremo de raíz, vasculatura, cortical y primordial usando el mismo índice de puntuación para GUS de “-” para ausencia de coloración, “+” para coloración débil, “++” para coloración intensa.

Ejemplo 12 Coloración con GUS de la planta entera

40 Las plantas enteras transgénicas de soja se generan por medio de la transformación de construcciones que contienen el polinucleótido del promotor representado por los nucleótidos de la posición 250 a la 998 de la SEQ ID NO: 1, los nucleótidos de la posición 500 a la 998 de la SEQ ID NO: 1, los nucleótidos de la posición 748 a la 998 de la SEQ ID NO: 1, los nucleótidos de la posición 1 a la 609 de la SEQ ID NO: 3, los nucleótidos de la posición 200 a la 609 de la SEQ ID NO: 3, los nucleótidos de la posición 400 a la 609 de la SEQ ID NO: 3, o los nucleótidos de la posición 1 a la 1.986 de la SEQ ID NO: 2 en asociación operativa con el gen reportero para GUS para caracterizar la expresión del polinucleótido del promotor en respuesta a la infección por nemátodos en raíces y tejidos de plantas enteras a lo largo del ciclo de vida de la planta. Los métodos representativos para la caracterización de los polinucleótidos del promotor en las plantas enteras de soja incluyen, pero no se limitan a las siguientes descripciones. Las semillas T1 de soja transgénica se analizan para detectar cigosidad y se germinan eventos de una sola copia, se desarrollaron en condiciones de invernadero y se tomaron muestras para detectar la expresión de GUS en las diversas etapas del desarrollo en tejidos de hoja, tallo, flor, embrión y vaina de semillas. Además, los tejidos radiculares se cosechan en diferentes momentos antes y después de la infección por SCN en raíces de control inoculadas y no inoculadas. Se evalúan múltiples plantas para cada evento a fin de determinar tendencias inconsistentes en el análisis de coloración con GUS. Las muestras cosechadas se cortan de la planta y se colocan inmediatamente en la solución de coloración de GUS que contiene X-Gluc (2 mg/l), se infiltran al vacío durante 20 minutos y se transfieren a 37° C durante 16 horas. Luego se observan los tejidos y se los califica de acuerdo con la intensidad de la coloración de GUS.

55

Listado de secuencia

<110> BASF Plant Science GmbH wiig, Aaron

<120> Promotores del gen de las plantas de tipo MtN3 inducibles por nemátodos y elementos reguladores relacionados

5 <130> PF 58864

<160> 45

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 998

10 <212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

```

ctccggttaa aatgatcatg aatgaaccga tatggtttgg gtaaagctga ataagctaac      60
tcgtgggtgac tagaaaacat tccaaaaaga tctactacta tactaaaaag tatatcctgc     120
ggctgtgggtt caacggtata gaataactga aatttagtga aacttattgg tgcccttaaa     180
taaacttgac agtttgttag gtttggtttc gcttatgtaa ccagaaactt cctaaactgt     240
caaattttat ctagaatctc tattaaagag ggcaacgaaa aaaaaaagt aacacatcat     300
ggagaagatg aaccactagc cactgccccg cagaaaatac aggctcgggc ctcgagtcac     360
atatcaacgt caagcccaga aactctggc ttgttcagag ctacttttag tatcaaaaaa     420
aaaacaaaag aagaaaagac attgctcttt ttaggtgttt atttcatttt taagtattta     480
accatatctc tataactatc tacaaaagaa acgtcgatcc aaagagtcag gttcacctct     540
cgaggacgta aaaacaagta acagataaaa aacctcgttc caaaaattaa tttggtatca     600
agaaaaaatc tgtatatata cactagaatt caaatcatg ggaacttttt ttttttatat     660
aagaaataac tcaattaact caaatttaaa acttaggttt tctcaaaaca ttagttctta     720
accataactt tttttcaaa ttttattcat actacaaaaa ttaataacag aaccatgtat     780
ttttaaatt taatatttaa taccattatt tcataattta ttatactttt attaattttg     840
taattattgg tgttccacag tgaagcgggt aacacacgct gaatctcgat atatatacgc     900
ttgccgatag aaaacactta gctcatattc tctcactttc tctctcagct tacgaacaag     960
aaaaaaagaa gaatctttag ccacctttga gatcaaaa     998

```

15 <210> 2

<211> 1986

ES 2 401 529 T3

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

```
cgactgtctc atcatttgtg attttttttt gccagtactt tatttttttt ggtaaactag      60
attggtctta taacttataa gttataacaa aatcacatcc ctctgtaaatttattttattt      120
taactttaac caaaaaatca aaagaataag ttgtgctgtg ttgaggacaa attttataat      180
aaagaaataa ggacacgaag gaagaatgga agtccttgct agttggtgcc attccaata      240
```

5

ES 2 401 529 T3

cgattccaac aacttagcca actttttttt tttttttttt ttttgataaa gaacacctta 300
 gccaaacttac gaaaagtttc taactctttc gttcttttatt agttctatat gtattaatgc 360
 atgcattatt gtgaccaaaa agtatatatt aaataaaaaa tgtatatttt catgtaattt 420
 tgtttgtaat attattttatt ttagttttat aaattcaccg tattctatta gttcgctagg 480
 ttcttgaaac tcaaaatttg attcttgagt gatatatggt aatctagcaa ctcgaattag 540
 cctgtaaatt aatttagaac aatgtaaaga tttcatgttt ttacgtataa attacatggt 600
 tgcaaattaa ttagtttgga ttttggtata taaatgagga tattttcatt catttaagtg 660
 ttttgatggt gagaaaacat aggtataaat gatgaatata taacaccaac atcataattg 720
 ttagtaaata ttcatttgaa aagagtgaga tcagaaattg attgataagg aagagacaat 780
 acaaaagaga tggaaaatga actaagtaaa ccataagcat aactggatgt gcatttcaag 840
 cataatttgg ctcaaaacta aatttataat taaaatagat aatcctaatt ttttgacaag 900
 attttttttt tgttgagaaa atgtttataa tatacaaagt tcttgataaa ggacactagt 960
 ttcacacccc acgtgttgct aaccggccac cacaaagcta acttaaaaat gtttttaact 1020
 tttttaattg gagttccttt ttatctccat gcattattat cattttctat tatatattcc 1080
 ataagcactt aaacaaatca gtcttcttta ttcgattcgg aatttaattg gatacaaaca 1140
 aaataatcaa agtttttggt tgtatatccg tttaaaaaaa gggagatttg tgtgtacgat 1200
 ttggatcaag cctttttgcg catcaaaatt gtcacttgca gacgttaatg tgcccgttag 1260
 accttcacaa tctattaaac taaataattt aaaaaatttc tattactgga tatatatata 1320
 tatatatata tataacgta taatcaggta aaattacttt cgtaaaaaca aaaaacaaaa 1380
 aatgatttac aaatttggtt ttgtaagata tatatatata tatatatata tatatgcgtt 1440
 tgtaatttgg gatggaatgg ttgctaatag gttgttgaat cacataattt gtgtgatata 1500
 tcatctagtg ttatacgtgt atataagttt gtgtaagaca ttgtatataa aaacaactta 1560
 atctccacac acgtctaata atgtcatata tatggctgta taactccaag aacttgaat 1620
 tagatttagt aaactcaaga aatgaacaac catctttcta ggttcgtttc tagttaatga 1680
 aacatccgtg tatgaaaatt atatgttatt ctaaaatttc cagtagtttt tctaattcaa 1740
 gcttggtctc tatgttttag aaaaaaagaa aaacttagag aagcaattgt tatttatctc 1800
 atcacaccaa tataattttt ggaaccaaatt tgtaaatta ccaaatgtcc caaacttggtg 1860
 atcaaattta gatgattatt tttaaatgaa cattaagaa aaactattat atatatacac 1920
 acccattata gacgtaactc tactgcttcc aacttttccc taatctttgt tcttccggcc 1980
 aatcaa 1986

<210> 3

<211> 609

<212> ADN

ES 2 401 529 T3

<213> Glycine max

<400> 3

```
gaagccacgt catgaagagt atatcatttc agtaatgttt tgagacgcct ctataatgct      60
ttaccaacaa aacaaaacaa aaaaaagaac atttgaaacc atttgtatta aaaaaaaaaa    120
ggatatattag gccataatat tataggtaac atgaaatata aatgacacg caagagtttt      180
gtcaaaaatg aaaccatcac acatcagaga ttatggcaaa taatgttttg tgtgtctctt      240
gcttcacca taacataagc ctctataact ggagagaaga aaaaaaaaaag tggaggggct      300
aggggtgggaa tttggaagaa tacagttata ttgagcattg agcaagttag tagaaagcct      360
ctcaatttgt acaaaatttg catccacatg attattaaag acgtagacag cacttcttcc      420
ttcttttttt ctataagttt cttatatatt gttcttcatg ttttaattatt attactttat      480
gtacgcgtct aacagtagtc ctccaaact gctataaata gagcctcttc aacgcacctc      540
ttggcagtac aaaaattatt catctcttct aagttctaata tttctaagca ttcagtaaaa      600
gaactaacc                                     609
```

<210> 4

5 <211> 956

<212> ADN

<213> Glycine max

<400> 4

ES 2 401 529 T3

gcattcagta	aaagaactaa	acatggcaga	gaccattcgt	ttggctgttg	ctgttcttgg	60
caatgcagcc	tcagttgccc	tttatgctgc	accaatggtt	acctttagaa	gagttataag	120
gaagaaaagc	acagaggagt	tttcatgctt	tccttacatc	attggcctct	tgaattgtct	180
ccttttcaact	tggtacgggt	tgctgtttgt	gagttacaag	tgggaaaatt	tccctctcgt	240
cacagttaat	ggagttggta	ttgttctcga	gttatcctat	gttctcattt	acttctggta	300
tgcttcagcc	aaaggaaaag	tgaaggtagc	catgactgca	ataccagttt	tgctgggtgt	360
ctctataaatt	gctgcagtgt	cagcttttgc	attccatgat	aatcatcacc	ggaagcttct	420
cgtaggtagc	atcggcttag	gtgtttcagt	aacaatgtat	ggatcccctt	tgattgtaat	480
gaagaaaagt	atacaaacca	agagtgtgga	attcatgcca	ctaccgttat	ccatgtgctc	540
atTTTTtagcc	actgttctct	ggctgattta	tggacttctc	attcgtgata	tattcgttgc	600
gggtcctagt	gcggttggaa	ctcccttggg	gatcttgcaa	cttgtacttt	actgtaaata	660
ccgaaaaggg	agtgttgtgg	aggatccaag	taagggggac	cttgagaagg	gtaacttggg	720
gaaggtggaa	atggaaaattg	ggaaagtgga	aatgaatgtc	acgaatcaca	tgaacggaca	780
ctcgtgaaca	atgCGTctaa	gggGaaagat	tgaagattac	agaatgttct	attcagattc	840
cttcttttta	tgTTTTatatt	cctttatTTT	aagacaaaat	gatccccctt	tagctttggt	900
tgTattgctc	acataTaaat	taagTtatat	tacttcccaa	aaaaaaaaaa	aaaaaa	956

<210> 5

<211> 254

<212> PRT

5 <213> Glycine max

<400> 5

ES 2 401 529 T3

Met Ala Glu Thr Ile Arg Leu Ala Val Ala Val Leu Gly Asn Ala Ala
1 5 10 15

Ser Val Ala Leu Tyr Ala Ala Pro Met Val Thr Phe Arg Arg Val Ile
20 25 30

Arg Lys Lys Ser Thr Glu Glu Phe Ser Cys Phe Pro Tyr Ile Ile Gly
35 40 45

Leu Leu Asn Cys Leu Leu Phe Thr Trp Tyr Gly Leu Pro Val Val Ser
50 55 60

Tyr Lys Trp Glu Asn Phe Pro Leu Val Thr Val Asn Gly Val Gly Ile
65 70 75 80

Val Leu Glu Leu Ser Tyr Val Leu Ile Tyr Phe Trp Tyr Ala Ser Ala
85 90 95

Lys Gly Lys Val Lys Val Ala Met Thr Ala Ile Pro Val Leu Leu Val
100 105 110

Phe Ser Ile Ile Ala Ala Val Ser Ala Phe Ala Phe His Asp Asn His
115 120 125

His Arg Lys Leu Leu Val Gly Ser Ile Gly Leu Gly Val Ser Val Thr
130 135 140

Met Tyr Gly Ser Pro Leu Ile Val Met Lys Lys Val Ile Gln Thr Lys
145 150 155 160

Ser Val Glu Phe Met Pro Leu Pro Leu Ser Met Cys Ser Phe Leu Ala
165 170 175

Thr Val Leu Trp Leu Ile Tyr Gly Leu Leu Ile Arg Asp Ile Phe Val
180 185 190

Ala Gly Pro Ser Ala Val Gly Thr Pro Leu Gly Ile Leu Gln Leu Val
195 200 205

Leu Tyr Cys Lys Tyr Arg Lys Gly Ser Val Val Glu Asp Pro Ser Lys
210 215 220

Gly Asp Leu Glu Lys Gly Asn Leu Glu Lys Val Glu Met Glu Ile Gly
225 230 235 240

Lys Val Glu Met Asn Val Thr Asn His Met Asn Gly His Ser
245 250

<211> 247

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 6

5

ES 2 401 529 T3

Met Asn Ile Ala His Thr Ile Phe Gly Val Phe Gly Asn Ala Thr Ala
1 5 10 15

Leu Phe Leu Phe Leu Ala Pro Ser Ile Thr Phe Lys Arg Ile Ile Lys
20 25 30

Asn Lys Ser Thr Glu Gln Phe Ser Gly Ile Pro Tyr Pro Met Thr Leu
35 40 45

Leu Asn Cys Leu Leu Ser Ala Trp Tyr Gly Leu Pro Phe Val Ser Lys
50 55 60

Asp Asn Thr Leu Val Ser Thr Ile Asn Gly Thr Gly Ala Val Ile Glu
65 70 75 80

Thr Val Tyr Val Leu Ile Phe Leu Phe Tyr Ala Pro Lys Lys Glu Lys
85 90 95

Ile Lys Ile Phe Gly Ile Phe Ser Cys Val Leu Ala Val Phe Ala Thr
100 105 110

Val Ala Leu Val Ser Leu Phe Ala Leu Gln Gly Asn Gly Arg Lys Leu
115 120 125

Phe Cys Gly Leu Ala Ala Thr Val Phe Ser Ile Ile Met Tyr Ala Ser
130 135 140

Pro Leu Ser Ile Met Arg Leu Val Val Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe
145 150 155 160

Met Pro Phe Phe Leu Ser Leu Phe Val Phe Leu Cys Gly Thr Ser Trp
165 170 175

Phe Val Tyr Gly Leu Ile Gly Arg Asp Pro Phe Val Ala Ile Pro Asn
180 185 190

Gly Phe Gly Cys Ala Leu Gly Thr Leu Gln Leu Ile Leu Tyr Phe Ile
195 200 205

Tyr Cys Gly Asn Lys Gly Glu Lys Ser Ala Asp Ala Gln Lys Asp Glu
210 215 220

Lys Ser Val Glu Met Lys Asp Asp Glu Lys Lys Gln Asn Val Val Asn
225 230 235 240

Gly Lys Gln Asp Leu Gln Val
245

<210> 7

<211> 263

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

5 <400> 7

ES 2 401 529 T3

Met Gly Asp Lys Leu Arg Leu Ser Ile Gly Ile Leu Gly Asn Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Leu Leu Tyr Thr Ala Pro Ile Val Thr Phe Ser Arg Val Phe
20 25 30

Lys Lys Lys Ser Thr Glu Glu Phe Ser Cys Phe Pro Tyr Val Met Thr
35 40 45

Leu Phe Asn Cys Leu Ile Tyr Thr Trp Tyr Gly Leu Pro Ile Val Ser
50 55 60

His Leu Trp Glu Asn Leu Pro Leu Val Thr Ile Asn Gly Val Gly Ile
65 70 75 80

Leu Leu Glu Ser Ile Phe Ile Phe Ile Tyr Phe Tyr Tyr Ala Ser Pro
85 90 95

Lys Glu Lys Ile Lys Val Gly Val Thr Phe Val Pro Val Ile Val Gly
100 105 110

Phe Gly Leu Thr Thr Ala Ile Ser Ala Leu Val Phe Asp Asp His Arg
115 120 125

His Arg Lys Ser Phe Val Gly Ser Val Gly Leu Val Ala Ser Ile Ser
130 135 140

Met Tyr Gly Ser Pro Leu Val Val Met Lys Lys Val Ile Glu Thr Arg
145 150 155 160

Ser Val Glu Tyr Met Pro Phe Tyr Leu Ser Phe Phe Ser Phe Leu Ala
165 170 175

Ser Ser Leu Trp Leu Ala Tyr Gly Leu Leu Ser His Asp Leu Phe Leu
180 185 190

Ala Ser Pro Asn Met Val Ala Thr Pro Leu Gly Ile Leu Gln Leu Ile
195 200 205

Leu Tyr Phe Lys Tyr Lys Asn Lys Lys Asp Leu Ala Pro Thr Thr Met
210 215 220

Val Ile Thr Lys Arg Asn Asp His Asp Asp Lys Asn Lys Ala Thr Leu
225 230 235 240

Glu Phe Val Val Asp Val Asp Arg Asn Ser Asp Thr Asn Glu Lys Asn
245 250 255

Ser Asn Asn Ala Ser Ser Ile
260

ES 2 401 529 T3

<210> 8

<211> 1127

<212> ADN

<213> Glycine max

5 <400> 8

```

actatagggc acgcgtggtc gacggcccgg gctggtatct ctacaaaatg gaagccacgt      60
catgaagagt atatcatttc agtaatgttt tgagacgcct ctataatgct ttaccaacaa      120
aacaaaacaa aaaaaagaac atttgaaacc atttgtatta aaaaaaaaaa ggtatattag      180
gccataatat tataggtaac atgaaatatc aatgacacg caagagtttt gtcaaaaatg      240
aaaccatcac acatcagaga ttatggcaaa taatgttttg tgtgtctctt gcttcaccca      300
taacataagc ctctataact ggagagaaga aaaaaaaaaag tggaggggct aggggtgggaa      360
tttgaagaa tacagttata ttgagcattg agcaagttga tagaaagctt ctcaatttgt      420
acaaaatttg catccacatg attattaaag acgtagacag cacttcttcc ttcttttttt      480
ctataagttt cttatatatt gttcttcatg ttttaatat attactttat gtacgcgtct      540
aacagtagtc ctcccaaact gctataaata gagcctcttc aacgcacctc ttggcagtac      600
aaaaattatt catctcttct aagttctaata tttctaagca ttcagtaaaa gaactaacca      660
tggcagagac cattcgcttg ggtgttgctg ttcttggtag ttcttcgctc attcattcct      720
tagctttgaa cgtatagggg gattaattat tattcattat ttgagtcttc aaaaaaagtg      780
actcattagt accactgttt gttttttttt ttcttgcagg caatgcagcc tcagttgccc      840
tttatgctgc accaatgtat gttacatggt acatatataa taacattgct gcccaaagt      900
cctccccttt agagaatgaa taaagtgctg aacgcttttt catgcttttc atgttccagg      960
gttaccttta gaagagttat aaggaagaaa agcacagagg agttttcatg ctttccttac     1020
atcattggcc tcttgaactg tctccttttc acttggtagc gtttgccat tgtttagctac     1080
aagtgggaaa atttccctct cgtcacagtt aatggagttg gtattgt                          1127

```

<210> 9

<211> 27

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia del cebador

<400> 9

aactgcagct ccggttaaaa tgatcat 27

<210> 10
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
5 <220>
<223> secuencia del cebador
<400> 10
aaggcgcgcc tttgatctc aaaggtggct 30
<210> 11
10 <211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia del cebador
15 <400> 11
aattaattaa cgactgtctc atcattgtg 30
<210> 12
<211> 32
<212> ADN
20 <213> Artificial
<220>
<223> secuencia del cebador
<400> 12
aaggcgcgcc ttgattggcc ggaagaacaa ag 32
25 <210> 13
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
30 <223> secuencia del cebador
<400> 13

	gtaatacgac tcactatagg gc	22
	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia del cebador	
	<400> 14	
	actatagggc acgcgtggt	19
10	<210> 15	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> secuencia del cebador	
	<400> 15	
	caccagcaaa actggattg cagtcattg	29
	<210> 16	
	<211> 31	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia del cebador	
	<400> 16	
25	acaataccaa ctccattaac tgtgacgaga g	31
	<210> 17	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> secuencia del cebador	

<400> 17
ctgcaggaag ccacgtcatg aagag 25
<210> 18
<211> 30
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia del cebador
<400> 18
10 ggcgcgccgg ttagttcttt tactgaatgc 30
<210> 19
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> secuencia del cebador
<400> 19
acgtctgcag ctacaaaaga aacgtcgatc c 31
<210> 20
20 <211> 36
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> secuencia del cebador
25 <400> 20
acgtctgcag cactactaca aaattaataa cagaac 36
<210> 21
<211> 26
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>

<223> secuencia del cebador
 <400> 21
 acgtggcgcg cctttgatc tcaaag 26
 <210> 22
 5 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador
 10 <400> 22
 gcatctgcag cacatcagag attatg 26
 <210> 23
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia del cebador
 <400> 23
 gcatctgcag gacgtagaca gcacttc 27
 20 <210> 24
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia del cebador
 <400> 24
 gcttgacgtc ggtagttct ttactg 27
 <210> 25
 <211> 15
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

- <220>
<223> Secuencia de consenso de la IUPAC
<220>
<221> característica nueva
- 5 <222> (2)..(2)
<223> n es a, c, g, o t
<220>
<221> característica nueva
<222> (7)..(7)
- 10 <223> n es a, c, g, o t
<220>
<221> característica nueva
<222> (15)..(15)
<223> n es a, c, g, o t
- 15 <400> 25
wndwmvnmkmd agaan 15
<210> 26
<211> 17
<212> ADN
- 20 <213> Artificial
<220>
<223> Secuencia de consenso de la IUPAC
<220>
<221> característica nueva
- 25 <222> (1)..(2)
<223> n es a, c, g, o t
<220>
<221> característica nueva
<222> (13)..(17)
- 30 <223> n es a, c, g, o t
<400> 26

nnwmwhmwst tannnnn 17

<210> 27

<211> 13

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso de la IUPAC

<220>

<221> característica nueva

10 <222> (11)..(12)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 27

wmwactdtd nnh 13

<210> 28

15 <211> 15

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso de la IUPAC

20 <220>

<221> característica nueva

<222> (1)..(1)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

25 <221> característica nueva

<222> (3)..(4)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica nueva

30 <222> (13)..(15)

<223> n es a, c, g, o t

- <400> 28
- nbnntatawa whnnn 15
- <210> 29
- <211> 11
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Secuencia de consenso de la IUPAC
- <220>
- 10 <221> característica nueva
- <222> (10)..(11)
- <223> n es a, c, g, o t
- <400> 29
- hawhhtawtn n 11
- 15 <210> 30
- <211> 17
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 20 <223> Secuencia de consenso de la IUPAC
- <220>
- <221> característica nueva
- <222> (2)..(2)
- <223> n es a, c, g, o t
- 25 <220>
- <221> característica nueva
- <222> (5)..(7)
- <223> n es a, c, g, o t
- <220>
- 30 <221> característica nueva
- <222> (17)..(17)

- <223> n es a, c, g, o t
 <400> 30
 dnwrnnntta adwdhdn 17
 <210> 31
- 5 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de consenso de la IUPAC
- 10 <220>
 <221> característica nueva
 <222> (1)..(2)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
- 15 <221> característica nueva
 <222> (7)..(7)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica nueva
- 20 <222> (9)..(10)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica nueva
 <222> (12)..(12)
- 25 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica nueva
 <222> (14)..(14)
 <223> n es a, c, g, o t
- 30 <220>
 <221> característica nueva

- <222> (16)..(16)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 31
 nnaamwnwnn dnwnwnrrd 19
- 5 <210> 32
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
- 10 <223> Secuencia de consenso de la IUPAC
 <220>
 <221> característica nueva
 <222> (1)..(3)
 <223> n es a, c, g, o t
- 15 <220>
 <221> característica nueva
 <222> (11)..(11)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 32
- 20 nnnatdatta n 11
 <210> 33
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 25 <220>
 <223> Secuencia de consenso de la IUPAC
 <220>
 <221> característica nueva
 <222> (15)..(15)
- 30 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 33

- dwwdwhwaam wbanwd 17
- <210> 34
- <211> 15
- <212> ADN
- 5 <213> Artificial
- <220>
- <223> Secuencia de consenso de la IUPAC
- <400> 34
- wraavtwd agaad 15
- 10 <210> 35
- <211> 17
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 15 <223> Secuencia de consenso de la IUPAC
- <220>
- <221> característica nueva
- <222> (16)..(16)
- <223> n es a, c, g, o t
- 20 <400> 35
- rramwacwst takmynh 17
- <210> 36
- <211> 13
- <212> ADN
- 25 <213> Artificial
- <220>
- <223> Secuencia de consenso de la IUPAC
- <400> 36
- wmwactdta kwh 13
- 30 <210> 37
- <211> 15

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso de la IUPAC

5 <400> 37

hydhtatawa tabrs 15

<210> 38

<211> 11

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso de la IUPAC

<400> 38

waawttawtm h 11

15 <210> 39

<211> 17

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia de consenso de la IUPAC

<220>

<221> característica nueva

<222> (2)..(2)

<223> n es a, c, g, o t

25 <400> 39

wnwrtdwtta awwdwww 17

<210> 40

<211> 19

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

- <223> Secuencia de consenso de la IUPAC
- <400> 40
- kraatwakr rywtwraak 19
- <210> 41
- 5 <211> 11
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Secuencia de consenso de la IUPAC
- 10 <220>
- <221> característica nueva
- <222> (11)..(11)
- <223> n es a, c, g, o t
- <400> 41
- 15 ymratdatta n 11
- <210> 42
- <211> 17
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 20 <220>
- <223> Secuencia de consenso de la IUPAC
- <400> 42
- wattwtaaa wgatewayaw 17
- <210> 43
- 25 <211> 190
- <212> ADN
- <213> Arabidopsis thaliana
- <220>
- <221> característica nueva
- 30 <222> (18)..(21)
- <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica nueva

<222> (97)..(131)

<223> n es a, c, g, o t

5 <220>

<221> característica nueva

<222> (147)..(154)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

10 <221> característica nueva

<222> (172)..(172)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica nueva

15 <222> (188)..(190)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 43

caaaaattaa taacagannn ntgtatTTTT aaaatttaat atttaatacc attatttcat	60
aatttattat acttttatta attttgtaat tattggnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	120
nnnnnnnnnn ntcgatatat atacgcnnnn nnnnagaaaa cacttagctc anattctctc	180
actttctnnn	190

<210> 44

20 <211> 211

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> característica nueva

25 <222> (16)..(61)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica nueva

<222> (77)..(161)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 44

attctaaaat	ttccannnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	60
naaaaactta	gagaagnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	120
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	ntagatgatt	atTTTTaaat	180
gaacattaa	gaaaaactat	tatatatata	c			211

5 <210> 45

<211> 157

<212> ADN

<213> Glycine max

<220>

10 <221> característica nueva

<222> (16)..(37)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica nueva

15 <222> (49)..(57)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica nueva

<222> (75)..(81)

20 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica nueva

<222> (97)..(124)

<223> n es a, c, g, o t

25 <220>

<221> característica nueva

<222> (136)..(139)

<223> n es a, c, g, o t

ES 2 401 529 T3

<400> 45

tttctataag tttctnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnaat attattacnn nnnnnnngcg 60

tctaacagta gtccnnnnn nctgctataa atagagnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120

nnnnaaaatt attcannnt tctaagttct aattttc 157

REIVINDICACIONES

1. Un promotor que comprende un polinucleótido del promotor aislado, capaz de mediar la expresión específica de la raíz y/o inducible por nemátodos, en donde el polinucleótido del promotor se selecciona del grupo de polinucleótidos que consiste de:
- 5 a) un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1 ó 3;
- b) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 748 a 998, o los nucleótidos 500 a 998, o los nucleótidos 573 a 922 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1;
- c) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 400 a 609, o los nucleótidos 260 a 609, o los nucleótidos 200 a 609 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;
- 10 d) un polinucleótido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c);
- e) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas a cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c);
- f) un polinucleótido que comprende un fragmento de al menos 50 nucleótidos consecutivos, o al menos 100 nucleótidos consecutivos, o al menos 200 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en SEQ ID NO: 1 o 3.
- 15 2. Un casete de expresión que comprende un polinucleótido del promotor de la reivindicación 1, que comprende además uno o más polinucleótidos operativamente enlazados.
3. El casete de expresión de la reivindicación 2, en donde dicho polinucleótido operativamente enlazado codifica un agente que interrumpe el metabolismo, el crecimiento y/o la reproducción de un nemátodo que parasita una planta, que confiere o mejora la resistencia de la planta a un nemátodo que la parasita, o que es tóxico para un nemátodo que parasita la planta.
- 20 4. Una planta transgénica transformada con un casete de expresión, en donde el casete de expresión comprende un polinucleótido aislado del promotor, capaz de mediar la expresión específica de la raíz y/o inducible por nemátodos, en donde el polinucleótido del promotor se selecciona del grupo de polinucleótidos que consiste de:
- 25 a) un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1 ó 3;
- b) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 748 a 998, o los nucleótidos 500 a 998, o los nucleótidos 573 a 922 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 1;
- c) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 400 a 609, o los nucleótidos 260 a 609, o los nucleótidos 200 a 609 de un polinucleótido que tiene la secuencia como la expuesta en la SEQ ID NO: 3;
- 30 d) un polinucleótido que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c);
- e) un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas a cualquiera de los polinucleótidos de a) hasta c);
- f) un polinucleótido que comprende un fragmento de al menos 50 nucleótidos consecutivos, o al menos 100 nucleótidos consecutivos, o al menos 200 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que tiene una secuencia como la expuesta en SEQ ID NO: 1 o 3.
- 35 en donde el casete de expresión comprende además uno o más polinucleótidos transgénicos operativamente enlazados al polinucleótido del promotor.
5. La planta transgénica de la reivindicación 4, en donde dicho polinucleótido transgénico operativamente enlazado codifica un agente que interrumpe el metabolismo, el crecimiento, y/o la reproducción de un nemátodo que parasita una planta, que confiere o mejora la resistencia de la planta a un nemátodo que la parasita, o que es tóxico para un nemátodo que parasita la planta.
- 40 6. La planta transgénica de la reivindicación 4 o 5, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste de maíz, trigo, cebada, sorgo, centeno, triticale, arroz, caña de azúcar, árboles cítricos, piña, coco, banana, café, té, tabaco, girasol, arvejas, alfalfa, soja, zanahoria, apio, tomate, patata, algodón, tabaco, berenjena, pimiento, colza

oleaginosa, canola, remolacha, repollo, coliflor, brócoli, lechuga, Lotus sp., Medicago truncatula, pastos perennes, ballico y Arabidopsis thaliana.

5 7. La planta transgénica de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste de *M. truncatula*, *M. sativa*, *G. max*, *P. sativum*, *A. hypogea*, *C. arietinum*, *V. faba*, *P. vulgaris*, *Lupinus albus*, *Lupinus luteus*, *Lupinus angustifolius* y *Lens culinaris*.

8. La planta transgénica de la reivindicación 7, en donde la planta es *Glycine max*.

10 9. Un método para conferir o mejorar la resistencia a los nemátodos en una planta, que comprende: a) preparar un casete de expresión como se define en la reivindicación 3, b) transformar una célula de una planta con el casete de expresión de a) en donde el polinucleótido del promotor induce la transcripción del segundo polinucleótido operativamente enlazado en la célula de la planta en respuesta a un estímulo del nemátodo; c) regenerar la célula de la planta transformada para producir una planta transgénica y d) seleccionar una planta que tenga mayor resistencia a los nemátodos en comparación con una planta que tiene el mismo genotipo sin comprender el casete de expresión de a).

15 10. Un método para conferir o mejorar la resistencia a los nemátodos en una planta, que comprende: a) preparar un casete de expresión como se reivindica en la reivindicación 3 que comprende un segundo polinucleótido que se encuentra en orientación antisentido respecto de un polinucleótido del promotor de la reivindicación 1, b) transformar una célula de una planta con la construcción de a) en donde el segundo polinucleótido interrumpe o reduce la expresión de la función reguladora del polinucleótido del promotor; y c) regenerar la célula de la planta transformada para producir una planta transgénica y d) seleccionar una planta que tenga mayor resistencia a los nemátodos en comparación con una planta que tiene el mismo genotipo sin comprender el casete de expresión de a).

20 11. El método de la reivindicación 9 o 10 en donde la planta se selecciona del grupo que consiste de maíz, trigo, cebada, sorgo, centeno, triticale, arroz, caña de azúcar, árboles cítricos, piña, coco, banana, café, té, tabaco, girasol, arvejas, alfalfa, soja, zanahoria, apio, tomate, patata, algodón, tabaco, berenjena, pimiento, colza oleaginosa, canola, remolacha, repollo, coliflor, brócoli, lechuga, Lotus sp., Medicago truncatula, pastos perennes, ballico y Arabidopsis thaliana.

25 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste de *M. truncatula*, *M. sativa*, *G. max*, *P. sativum*, *A. hypogea*, *C. arietinum*, *V. faba*, *P. vulgaris*, *Lupinus albus*, *Lupinus luteus*, *Lupinus angustifolius* y *Lens culinaris*.

30 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde la planta es *Glycine max*.

Figura 1: Secuencia de la región promotora de *A. thaliana* del locus At1g21460 (pWT128) (SEQ ID NO: 1). Una caja TATA se encuentra ubicada del par de bases 830 al par de bases 836 y está marcada en negrita.

```

1  CTCCGGTTAA AATGATCATG AATGAACCGA TATGGTTTGG GTAAAGCTGA
51  ATAAGCTAAC TCGTGGTGAC TAGAAAACAT TCCAAAAAGA TCACTCACTA
101 TACTAAAAAG TATATCCTGC GGCTGTGGTT CAACGGTATA GAATAACTGA
151 AATTTAGTGA AACTTATTGG TGCCCTTAAA TAAACTTGAC AGTTTGTTAG
201 GTTTGGTTTC GCTTATGTAA CCAGAAACTT CCTAAACTGT CAAATTTTAT
251 CTAGAACTCT TATTAAAGAG GGCAACGAAA AAAAAAAGT AACACATCAT
301 GGAGAAGATG AACCACTAGC CACTGCCCCG CAGAAAATAC AGGCTCGGGC
351 CTCGAGTCAC ATATCAACGT CAAGCCGAGA ACACTCTGGC TTGTTCAGAG
401 CACTTTTTAG TATCAAACAA AAAACAAAAG AAGAAAAGAC ATTGCTCTTT
451 TTAGGTGTTT ATTTCATTTT TAAGTATTTA ACCATATCTC TATAACTATC
501 TACAAAAGAA ACGTCGATCC AAAGAGTCAG GTTCACCTCT CGAGGACGTA
551 AAAACAAGTA ACAGATAAAA AACCTCGTTC CAAAATTA TTTGGTATCA
601 AGAAAAAATC TGTATATATA CACTAGAATT CAAAATCATG GGAACTTTTT
651 TTTTTTATAT AAGAAATAAC TCAATTAAC CAAATTTAAA ACTTAGGTTT
701 TCTCAAACA TTAGTTCTTA ACCATAACTT TTTTTTCAA TTTTATTCAT
751 ACTACAAAA TTAATAACAG AACCATGTAT TTTTAAAATT TAATATTTAA
801 TACCATTATT TCATAATTTA TTATACTTTT ATTAATTTTG TAATTATTGG
851 TGTTCCACAG TGAAGCGGTT AACACACGCT GAATCTCGAT ATATATACGC
901 TTGCCGATAG AAAACACTTA GCTCATATTC TCTCACTTTC TCTCTCAGCT
951 TACGAACAAG AAAAAAAGAA GAATCTTTAG CCACCTTTGA GATCAAAA

```

Figura 2: Secuencia de la región promotora de *A. thaliana* del locus At5g53190 (SEQ ID NO: 2).

```

1  CGACTGCTC  ATCATTGTTG  ATTTTTTTTT  GCCAGTACTT  TATTTTTTTT
51  GGTAAGTAG  ATTGGTCTTA  TAACTTATAA  GTTATAACAA  AATCACATCC
101 CTCTGTAAAT  TTATTTATTT  TAACTTTAAC  CAAAAAATCA  AAAGAATAAG
151 TTGTGCTGTG  TTGAGGACAA  ATTTTATAAT  AAAGAAATAA  GGACACGAAG
201 GAAGAATGGA  AGTCCTTGCT  AGTTGGTGCC  ATTTCCAATA  CGATTCCAAC
251 AACTTAGCCA  ACTTTTTTTT  TTTTTTTTTT  TTTTGATAAA  GAACACCTTA
301 GCCAACTTAC  GAAAAGTTTC  TAACTCTTTC  GTTCTTTATT  AGTTCATAT
351 GTATTAATGC  ATGCATTATT  GTGACCAAAA  AGTATATATT  AAATAAAAAA
401 TGTATATTTT  CATGTAATTT  TGTTTGTAAT  ATTATTTATT  TTAGTTTTAT
451 AAATTCACCG  TATTCTATTA  GTTCGCTAGG  TTCTTGAAAC  TCAAAATTTG
501 ATTCTTGAGT  GATATATGGT  AATCTAGCAA  CTCGAATTAG  CCTGTAAATT
551 AATTTAGAAC  AATGTAAAGA  TTTCATGTTT  TTACGTATAA  ATTACATGTT
601 TGCAAATTAA  TTAGTTTGGA  TTTTGGTATA  TAAATGAGGA  TATTTTCATT
651 CATTTAAGTG  TTTTGATGTT  GAGAAAACAT  AGGTATAAAT  GATGAATATA
701 TAACACCAAC  ATCATAATTG  TTAGTAAATA  TTCATTTGAA  AAGAGTGAGA
751 TCAGAAATTG  ATTGATAAGG  AAGAGACAAT  ACAAAGAGA  TGGAAAATGA
801 ACTAAGTAAA  CCATAAGCAT  AACTGGATGT  GCATTTCAAG  CATAATTTGG
851 CTCAAAATA  AATTTATAAT  TAAAATAGAT  AATCCTAATT  TTTTGACAAG
901 ATTTTTTTTT  TGTGAGAAA  ATGTTTATAA  TATACAAAGT  TCTTGATAAA
951 GGACACTAGT  TTCACACCCC  ACGTGTGCT  AACCGGCCAC  CACAAAGCTA
1001 ACTTAAAAAT  GTTTTAACT  TTTTTAATTG  GAGTTCCTTT  TTATCTCCAT
1051 GCATTATTAT  CATTTTCTAT  TATATATTCC  ATAAGCACTT  AAACAAATCA
1101 GTCTTCTTTA  TTCGATTCGG  AATTTAATGT  GATACAAACA  AAATAATCAA
1151 AGTTTTTGTG  TGTATATCCG  TTTAAAAAAA  GGGAGATTTG  TGTGTACGAT
1201 TTGGATCAAG  CCTTTTTGCG  CATCAAAATT  GTCACTTGCA  GACGTTAATG
1251 TGCCCGTTAG  ACCTTCACAA  TCTATTAAAC  TAAATAATTT  AAAAAATTTT
1301 TATTACTGGA  TATATATATA  TATATATATA  TATAACGTTA  TAATCAGGTA
1351 AAATFACTTT  CGTAAAAACA  AAAAAACAAA  AATGATTTAC  AAATTTGGTT
1401 TTGTAAGATA  TATATATATA  TATATATATA  TATATGCGTT  TGTAATTTGG
1451 GATGGAATGG  TTGCTAATAG  GTTGTTGAAT  CACATAATTT  GTGTGATATA
1501 TCATCTAGTG  TTATACGTGT  ATATAAGTTT  GTGTAAGACA  TTGTATATAT
1551 AAACAACCTA  ATCTCCACAC  ACGTCTAATA  ATGTCATATA  TATGGTCTGA
1601 TAACTCCAAG  AACTTGAAAT  TAGATTTAGT  AACTCAAGA  AATGAACAAC
1651 CATCTTTCTA  GGTTCGTTTC  TAGTTAATGA  AACATCCGTG  TATGAAAATT
1701 ATATGTTATT  CTAAAATTTT  CAGTAGTTTT  TCTAATTCOA  GCTTGGTCTC
1751 TATGTTTTAG  AAAAAAAGAA  AAATTTAGAG  AAGCAATTGT  TATTTATCTC
1801 ATCACACCAA  TATAATTTTT  GGAACCAAA  TGTTAAATTA  CCAATGTCC
1851 CAAACTGTG  ATCAAATTTA  GATGATTATT  TTTAAATGAA  CATTAAAGAA
1901 AAATATTAT  ATATATACAC  ACCATTATA  GACGTAACCT  TACTGCTTCC
1951 AACTTTTCCC  TAATCTTTGT  TCTTCCGCC  AATCAA

```

Figura 3: Secuencia de la región promotora de *Glycine max* del gen correspondiente al clon 47116125 de ADNc contenido en pAW222qcz denominado p-47116125 (SEQ ID NO: 3). Una caja TATA se encuentra ubicada en el par de bases 513 al par de bases 519 y está marcada en negrita.

```

1 GAAGCCACGT CATGAAGAGT ATATCATTTC AGTAATGTTT TGAGACGCCT
51 CTATAATGCT TTACCAACAA AACAAAACAA AAAAAAGAAC ATTTGAAACC
101 ATTTGTATTA AAAAAAAAAA GGTATATTAG GCCATAATAT TATAGGTAAC
151 ATGAAATATC AAATGACACG CAAGAGTTTT GTCAAAAATG AAACCATCAC
201 ACATCAGAGA TTATGGCAAA TAATGTTTTG TGTGTCTCTT GCTTCACCCA
251 TAACATAAGC CTCTATAACT GGAGAGAAGA AAAAAAAAAAG TGGAGGGGCT
301 AGGGTGGGAA TTTGGAAGAA TACAGTTATA TTGAGCATTG AGCAAGTTGA
351 TAGAAAGCTT CTCAATTTGT ACAAATTTG CATCCACATG ATTATTAAAG
401 ACGTAGACAG CACTTCTTCC TTCTTTTTTT CTATAAGTTT CTTATATATT
451 GTTCTTCATG TTTTAATATT ATTACTTTAT GTACGCGTCT AACAGTAGTC
501 CTCCCAAACTGTATAAATA GAGCCTCTTC AACGCACCTC TTGGCAGTAC
551 AAAAAATTATT CATCTCTTCT AAGTTCTAAT TTTCTAAGCA TTCAGTAAAA
601 GAACTAACC

```

Figura 4: Secuencia del clon 47116125 de ADNc de *Glycine max*. El codón de inicio del orf está en negrita en las bases 23 - 25. El codón de detención del orf está en negrita e itálicas en las bases 785 - 787. El orf completo abarca las bases 23 - 787.

```

1  GCATTCAGTA AAAGAACTAA ACATGGCAGA GACCATTCGT TTGGCTGTTG
51  CTGTTCTTGG CAATGCAGCC TCAGTTGCC TTTATGCTGC ACCAATGGTT
101 ACCTTTAGAA GAGTTATAAG GAAGAAAAGC ACAGAGGAGT TTTCATGCTT
151 TCCTTACATC ATTGGCCTCT TGAATTGTCT CCTTTTCACT TGGTACGGTT
201 TGCTGTTTGT GAGTTACAAG TGGGAAAATT TCCCTCTCGT CACAGTTAAT
251 GGAGTIGGIA TTGTTCTCGA GTTATCCTAT GTTCTCATTT ACTTCTGGTA
301 TGCTTCAGCC AAAGGAAAGG TGAAGGTAGC CATGACTGCA ATACCAGTTT
351 TGCTGGTGTT CTCTATAATT GCTGCAGTGT CAGCTTTTGC ATTCCATGAT
401 AATCATCACC GGAAGCTTCT CGTAGGTAGC ATCGGCTTAG GTGTTTCAGT
451 AACAAIGTAT GGATCCCCTT TGATTGTAAT GAAGAAAGTT ATACAAACCA
501 AGAGTGTGGA ATTCATGCCA CTACCGTTAT CCATGTGCTC ATTTTTAGCC
551 ACTGTTCTCT GGCTGATTTA TGGACTTCTC ATTCGTGATA TATTCGTTGC
601 GGGTCCTAGT GCGGTTGGAA CTCCCTTGGG GATCTTGCAA CTTGTACTTT
651 ACTGTAAATA CCGAAAAGGG AGTGTGTGIGG AGGATCCAAG TAAGGGGGAC
701 CTTGAGAAGG GTAACTTGGA GAAGGTGGAA ATGGAAATTG GGAAAGTGGA
751 AATGAATGTC ACGAATCACA TGAACGGACA CTCGTGAACA ATGCGTCTAA
801 GGGGAAAGAT TGAAGATTAC AGAATGTTCT ATTCAGATTC CTTCTTTTAA
851 TGTTTTATTT CCTTTATTTT AAGACAAAAT GATCCCCCCT TAGCTTTGGT
901 TGTATTGCTC ACATATAAAT TAAGTTATAT TACTTCCCAA AAAAAAAAAA
951 AAAAAA

```

ES 2 401 529 T3

Figura 5: Alineamiento de secuencia de las secuencias de aminoácidos del clon 47116125 de ADNc de *Glycine max* (SEQ ID NO: 5), locus At1g21460 de *A. thaliana* (SEQ ID NO: 6) y locus At5g53190 de *A. thaliana* (SEQ ID NO: 7).

		1		50
47116125	(1)	MAETIRLAVAVL	GNAASVALYAAPMVT	FRRVIRKKSTEEFSCFPYIIGLL
At1g21460	(1)	-MNIAHTIFGV	FGNATALFLFLAPSITFKRI	IKNKSTEQFSGIPYPMILL
At5g53190	(1)	MGDKLRLSIGIL	GNGASLLLYTAPIVTF	SRVFKKKSTEEFSCFPYVMTLF
		51		100
47116125	(51)	NCLLFTWYGLP	VVSYKWFNPLVTVNGVGIV	LELSYVLIYFWYASAKGKV
At1g21460	(50)	NCLLSAWYGLP	FVS--KDNTLVSTINGTGAVI	ETVYVLIFLFYAPKKEKI
At5g53190	(51)	NCLIYTWYGLP	IVSHLWENLPLVTINGVGIL	LESIFIFIYFYASPKEKI
		101		150
47116125	(101)	KVAMTAIPVLL	VFSIIAAVSFAFHDNHHRK	LLVGSIGLGVSVTMYGSPL
At1g21460	(98)	KIFGIFSCVLA	VFATVALVSLFALQGN-GR	KLFCGLAATVFSIIMYASPL
At5g53190	(101)	KVGVTFPVPI	VGFGLTTAISALVFDDHR	HRKSFVGSVGLVASISMYGSPL
		151		200
47116125	(151)	IVMKKVIQTK	SVEFMPLPLSMCSFLATV	LWLIIYGLLIRDIFVAGPSAVGT
At1g21460	(147)	SIMRLVVKTK	SVEFMFFLSLFVFLCGT	SWFVYGLIGRDPFVAIPNGFGC
At5g53190	(151)	VVMKKVIETR	SVEYMPFYLSFFSFLASS	LWLAYGLLSHDLFLASPNMVA
		201		250
47116125	(201)	PLGILQLVLY	CKYRKG-----SVVEDP	SKGDLEKGNLEKVEMEIGKVEMN
At1g21460	(197)	ALGTLQLILY	FIYCGNK-----GEKSADA	QKDEKSVEMKDDEKKQN
At5g53190	(201)	PLGILQLILY	FKYKNKKDLAPTTMVIT	KRNDHDDKNKATLEFVVDVDRNS
		251	263	
47116125	(246)	VTNHMNGHS	----	
At1g21460	(238)	VVNGKQDLQV	---	
At5g53190	(251)	DTNEKNSN	NASSI	

Figura 6: Secuencia de la secuencia derivada del desplazamiento sobre el genoma de pAW127 (SEQ ID NO: 8). El codón de inicio para la secuencia codificadora de 47116125 está marcado en negrita y se encuentra ubicado en 660 - 662 pb. Existe un codón de detención secuencia arriba de este codón de inicio en el mismo marco marcado en negrita e itálica que comienza en 627 pb. La secuencia del promotor clonada en pAW222qcz está representada de 51 a 659 pb.

```

1  ACTATAGGGC  ACGCGTGGTC  GACGGCCCGG  GCTGGTATCT  CTACAAAATG
51  GAAGCCACGT  CATGAAGAGT  ATATCATTTT  AGTAATGTTT  TGAGACGCCT
101 CTATAATGCT  TTACCAACAA  AACAAAACAA  AAAAAAGAAC  ATTTGAAACC
151 ATTTGTATTA  AAAAAAAAAA  GGTATATTAG  GCCATAATAT  TATAGGTAAC
201 ATGAAATATC  AAATGACACG  CAAGAGTTTT  GTCAAAAATG  AAACCATCAC
251 ACATCAGAGA  TTATGGCAA  TAATGTTTTG  TGTGTCTCTT  GCTTCACCCA
301 TAACATAAGC  CTCTATAACT  GGAGAGAAGA  AAAAAAAG  TGGAGGGGCT
351 AGGGTGGGAA  TTGGAAGAA  TACAGTTATA  TTGAGCATTG  AGCAAGTTGA
401 TAGAAAGCTT  CTCAATTTGT  ACAAATTTG  CATCCACATG  ATTATTAAG
451 ACGTAGACAG  CACTTCTTCC  TTCTTTTTTT  CTATAAGTTT  CTTATATATT
501 GTTCTTCATG  TTTTAATATT  ATTACTTTAT  GTACGCGTCT  AACAGTAGTC
551 CTCCCAAAC  GCTATAAATA  GAGCCTCTTC  AACGCACCTC  TTGGCAGTAC
601 AAAAATTATT  CATCTCTTCT  AAGTTCTAAT  TTTCTAAGCA  TTCAGTAAAA
651 GAACTAACCA TGGCAGAGAC  CATTTCGCTG  GGTGTTGCTG  TTCTTGGTAC
701 TTCTTCGTTT  ATTCATTCCT  TAGCTTTGAA  CGTATAGGGT  GATTAATTAT
751 TATTCATTAT  TTGAGTCTTC  AAAAAAGTG  ACTCATTAGT  ACCACTGTTT
801 GTTTTTTTTT  TTCTTGCAGG  CAATGCAGCC  TCAGTTGCCC  TTTATGCTGC
851 ACCAATGTAT  GTTACATGTT  ACATATATAA  TAACATTGCT  GCCCAAATGT
901 CCTCCCCTTT  AGAGAATGAA  TAAAGTGCTG  AACGCTTTTT  CATGCTTTTC
951 ATGTTCCAGG  GTTACCTTTA  GAAGAGTTAT  AAGGAAGAAA  AGCACAGAGG
1001 AGTTTTTCATG  CTTTCCTTAC  ATCATTGGCC  TCTTGAAGTG  TCTCCTTTTC
1051 ACTTGGTACG  GTTTGCCTAT  TGTTAGCTAC  AAGTGGGAAA  ATTTCCCTCT
1101 CGTCACAGTT  AATGGAGTTG  GTATTGT

```

Figura 7a:

Alineamiento de secuencia del clon 47116125 de ADNc de *G. max* (SEQ ID NO: 4) y secuencia de *G. max* derivada del desplazamiento sobre el genoma contenida en pAW127 (SEQ ID NO: 8) que dirige al clon 47116125 de ADNc. El codón de inicio ATG del clon 47116125 de ADNc de *G. max* (SEQ ID NO: 4) comienza en pb 660 de la secuencia pAW127. Un polinucleótido del promotor de 609 pb es descrito por la SEQ ID NO: 3 y se deriva de las bases 51 a 659 de la secuencia pAW127 (SEQ ID NO: 8). La falta de coincidencias de las secuencias entre la secuencia pAW127 y la secuencia de ADNc de 47116125 está marcada con un asterisco.

pAW127	#1	ACTATAGGGC ACGCGTGGTC GACGGCCCGG GCTGGTATCT CTACAAAATG
pAW127	#51	GAAGCCACGT CATGAAGAGT ATATCATTTC AGTAATGTTT TGAGACGCCT
pAW127	#101	CTATAATGCT TTACCAACAA AACAAAACAA AAAAAAGAAC ATTTGAAACC
pAW127	#151	ATTTGTATTA AAAAAAAAAA GGTATATTAG GCCATAATAT TATAGGTAAC
pAW127	#201	ATGAAATATC AAATGACACG CAAGAGTTTT GTCAAAAATG AAACCATCAC
pAW127	#251	ACATCAGAGA TTATGGCAA TAATGTTTTG TGTGTCTCTT GCTTCACCCA
pAW127	#301	TACATAAGC CTCTATAACT GGAGAGAAGA AAAAAAAAAAG TGGAGGGGCT
pAW127	#351	AGGGTGGGAA TTTGGAAGAA TACAGTTATA TTGAGCATTG AGCAAGTTGA
pAW127	#401	TAGAAAGCTT CTCAATTTGT ACAAATTTG CATCCACATG ATTATTAAAG
pAW127	#451	ACGTAGACAG CACTTCTTCC TTCTTTTTTT CTATAAGTTT CTTATATATT
pAW127	#501	GTTCTTCATG TTTTAATATT ATTACTTTAT GTACGCGTCT AACAGTAGTC
pAW127	#551	CTCCCAAAC TCTATAAATA GAGCCTCTTC AACGCACCTC TTGGCAGTAC
47116125	#1	GCA TTCAGTAAAA
pAW127	#601	AAAAATTATT CATCTCTTCT AAGTTCTAAT TTTCTAAGCA TTCAGTAAAA
47116125	#14	GAACTAAACA TGGCAGAGAC CATTGTTTTG GCTGTTGCTG TTCTT:::::
pAW127	#651	GAACTAACCA TGGCAGAGAC CATTGCTTGG GGTGTTGCTG TTCTTGGTAC
		* * *
47116125	#64	:::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
pAW127	#701	TTCTTCGTTT ATTCATTCTT TAGCTTTGAA CGTATAGGGT GATTAATTAT
47116125	#114	:::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
pAW127	#751	TATTCATTAT TTGAGTCTTC AAAAAAAGTG ACTCATTAGT ACCACIGTTT

Figura 8: Patrones de expresión de β -glucuronidasa de los vectores binarios pAW222qcz y pWT128 en el ensayo de la raíz vellosa de soja expuesto en el Ejemplo 2. Las raíces vellosas infectadas por nemátodos de quiste de la soja y las raíces vellosas de control no infectadas se tiñeron 12 días después de la inoculación del SCN. Se utilizó el siguiente índice de puntuación: “-” para ausencia de coloración de GUS, “+” para coloración leve de GUS, “++” para coloración intensa de GUS.

Infectado por SCN:

SEQ ID	Construcción	Punta de raíz	Vascular	Cortical	Sincitios
1	PWT128	-	+	-	+
3	PAW222qcz	-	++	-	++

Control no infectado:

SEQ ID	Construcción	Punta de raíz	Vascular	Cortical
1	PWT128	-	+	-
3	pAW222qcz	-	++	-

Figura 9: Patrones de expresión de β -glucuronidasa de los vectores binarios pWT128, RTJ113 y RTJ114 en el ensayo de raíz vellosa de soja expuesto en el Ejemplo 4. Las raíces vellosas infectadas por nemátodos de quiste de la soja y las raíces vellosas de control no infectadas se tiñeron 12 días después de la inoculación del SCN. Se utilizó el siguiente índice de puntuación: “-” para ausencia de coloración de GUS, “+” para coloración leve de GUS, “++” para coloración intensa de GUS.

Infectado por SCN:

SEQ ID	Construcción	Punta de raíz	Vascular	Cortical	Sincitios
1	PWT128	-	+	-	+
1	RTJ113	-	++	-	+
1	RTJ114	-	++	-	+

Control no infectado:

SEQ ID	Construcción	Punta de raíz	Vascular	Cortical
1	PWT128	-	+	-
1	RTJ113	-	++	-
1	RTJ114	-	++	-

Figura 10: Patrones de expresión de β -glucuronidasa de los vectores binarios pAW222qcz, RTJ117 y RTJ118 en el ensayo de raíz vellosa de soja expuesto en el Ejemplo 4. Las raíces vellosas infectadas por nemátodos de quiste de la soja y las raíces vellosas de control no infectadas se tiñeron 12 días después de la inoculación del SCN. Se utilizó el siguiente índice de puntuación: “-” para ausencia de coloración de GUS, “+” para coloración leve de GUS, “++” para coloración intensa de GUS.

Infectado por SCN:

SEQ ID	Construcción	Punta de raíz	Vascular	Cortical	Sincitios
3	PAW222qcz	-	++	-	++
3	RTJ117	-	++	-	++
3	RTJ118	-	+	-	++

Control no infectado:

SEQ ID	Construcción	Punta de raíz	Vascular	Cortical
3	PAW222qcz	-	++	-
3	RTJ117	-	++	-
3	RTJ118	-	+	-

Figura 11: Cebadores de PCR utilizados para obtener los polinucleótidos del promotor de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la supresión de 500 pb del promotor de *A. thaliana* de locus At1g21460 (SEQ ID NO: 1), la supresión de 251 pb del promotor de *A. thaliana* de locus At1g21460 (SEQ ID NO: 1), la supresión de 410 pb del promotor de *Glycine max* p-47116125 (SEQ ID NO: 3) y la supresión de 210 pb del promotor de *Glycine max* p-47116125 (SEQ ID NO: 3).

Cebador común	SEQ ID NO	Seq. 5' a 3'
At1g21460prF	9	AACTGCAGCTCCGGTAAAATGATCAT
At1g21460prR	10	AAGGCGCGCCTTTTGATCTCAAAGGTGGCT
At5g53190prF	11	AATTAATTAACGACTGTCTCATCATTTGTG
At5g53190prR	12	AAGGCGCGCCTTGATTGGCCGGAAGAACAAAG
AP1	13	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	14	ACTATAGGGCACGCGTGGT
47116125GW	15	CACCAGCAAACTGGTATTGCAGTCATGG
47116125GWnest	16	ACAATACCAACTCCATTAAGTGTGACGAGAG
47116125prF	17	CTGCAGGAAGCCACGTCATGAAGAG
47116125prR	18	GGCGCGCCGGTTAGTTCTTTTACTGAATGC
At1g21460pr499bpF	19	ACGTCTGCAGCTACAAAAGAAACGTCGATCC
At1g21460pr251bpF	20	ACGTCTGCAGCATACTACAAAATTAATAACAGAAC
At1g21460prR2	21	ACGTGGCGCGCCTTTTGATCTCAAAG
47116125pr410bpF	22	GCATCTGCAGCACATCAGAGATTATG
47116125pr210bpF	23	GCATCTGCAGGACGTAGACAGCACTTC
47116125prR2	24	GCTTGACGTCGGTTAGTTCTTTTACTG

Figura 12: Tabla que muestra las fórmulas generales de secuencia (fórmula 1 y fórmula 2) de los elementos de secuencia identificados en fragmentos mínimos del polinucleótido del promotor.

elemento de la secuencia	fórmula general 1 para el elemento de la secuencia	SEQ ID NO:	fórmula general 2 para el elemento de la secuencia	SEQ ID NO:
elemento 1	wndwmvnmkdagaan	25	wraavttwdagaad	34
elemento 2	nnwmwhmwsttannnnn	26	rramwacwsttakmynh	35
elemento 3	wmwactdtdnnh	27	wmwactdttakwh	36
elemento 4	nbnntatawawhnnn	28	hydhtatawatabrs	37
elemento 5	hawhwtawtnn	29	waawttawtmh	38
elemento 6	dnwrnnnttaadwdhdn	30	wnwrdtwtaawwdwwv	39
elemento 7	nnaamwnwnndnwnwnrrd	31	kraaatwakrrywtrwraak	40
elemento 8	nnnatdattan	32	ymratdattan	41
elemento 9	dwwdwhwaamwbwanwd	33	wattwwtaaawgwayaw	42

Símbolos de letras usados como abreviaturas para nucleótidos alternativos

símbolo	alternativas de nucleótidos
a	a (adenina)
g	g (guanina)
c	c (citosina)
t	t (timina)
r	g o a
y	t o c
m	a o c
k	g o t
s	g o c
w	a o t
b	g o c o t
d	a o g o t
h	a o c o t
v	a o g o c
n	a o g o c o t

Figura 13: Secuencia general para el fragmento mínimo del polinucleótido del promotor de la región promotora de *A. thaliana* del locus At1g21460 (pWT128) (SEQ ID NO: 43) y tabla que muestra 16 elementos de secuencia contenidos en la SEQ ID NO: 43.

```

1  CAAAAATTAA TAACAGANNN NTGTATTTTT AAAATTTAAT ATTTAATACC
51 ATTATTTTCAT AATTTATTAT ACTTTTATTA ATTTTGTAAT TATTGGNNNN
101 NNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNN NTCGATATAT ATACGCNNNN
151 NNNNAGAAAA CACTTAGCTC ANATTCTCTC ACTTTCINNN
    
```

elemento (No.)	posición inicial (nucleótido)	posición final (nucleótido)	más cadena (+) o menos cadena (-)
elemento 5	3	13	+
elemento 6	1	17	-
elemento 6	22	38	+
elemento 5	32	42	+
elemento 6	30	46	-
elemento 6	37	53	-
elemento 7	41	59	-
elemento 5	60	70	+
elemento 3	68	80	+
elemento 9	67	83	-
elemento 5	75	85	-
elemento 8	86	96	-
elemento 4	132	146	+
elemento 2	155	171	+
elemento 1	173	187	-

Figura 14: Secuencia general para el fragmento mínimo del polinucleótido del promotor de la región promotora de *A. thaliana* del locus At5g53190 (SEQ ID NO: 44) y tabla que muestra 9 elementos de secuencia contenidos en la SEQ ID NO: 44.

```

1  ATTCTAAAAT  TTCCANNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN
51  NNNNNNNNNN  NAAAACTTA  GAGAAGNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN
101 NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN  NNNNNNNNNN
151 NNNNNNNNNN  NTAGATGATT  ATTTTAAAT  GAACATTAAA  GAAAAACTAT
201 TATATATATA  C
    
```

elemento (No.)	posición inicial (nucleótido)	posición final (nucleótido)	más cadena (+) o menos cadena (-)
elemento 1	1	15	-
elemento 1	62	76	+
elemento 8	162	172	+
elemento 6	168	184	+
elemento 9	170	186	+
elemento 1	180	194	+
elemento 2	191	207	+
elemento 3	193	205	+
elemento 4	197	211	+

Figura 15: Secuencia general para el fragmento mínimo del polinucleótido del promotor de la región promotora de *Glycine max* del gen correspondiente al clon 47116125 de ADNc (SEQ ID NO: 45) y tabla que muestra 7 elementos de secuencia contenidos en la SEQ ID NO: 45.

```

1 TTTCTATAAG TTTCTNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNAAT ATTATTACNN
51 NNNNNNNGCG TCTAACAGTA GTCCNNNNNN NCTGCTATAA ATAGAGNNNN
101 NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNAAAATT ATTCANNNT TCTAAGTTCT
151 AATTTTC
    
```

elemento (No.)	posición inicial (nucleótido)	posición final (nucleótido)	más cadena (+) o menos cadena (-)
elemento 1	1	15	-
elemento 5	38	48	+
elemento 2	58	74	-
elemento 3	60	72	-
elemento 4	82	96	+
elemento 5	125	135	+
elemento 7	139	157	-