

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 437**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2007 E 11002905 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2354233**

54 Título: **Promotor sintético inducible por patógenos**

30 Prioridad:

22.06.2006 DE 102006029129

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

02.03.2015

73 Titular/es:

**KWS SAAT AG (100.0%)
Grimsehlstrasse 31, Postfach 1463
37555 Einbeck, DE**

72 Inventor/es:

SCHMIDT, KLAUS DR.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 530 437 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

Promotor sintético inducible por patógenos

- 5 La presente invención se refiere a un promotor sintético inducible por patógenos que es apropiado para la regulación de la transcripción de un ácido nucleico y comprende un promotor mínimo. Además, la presente invención se refiere a una célula vegetal transgénica así como a plantas transgénicas. La presente invención se refiere además a un procedimiento para la producción de una planta resistente frente a patógenos.
- 10 Se conocen diferentes procedimientos para la obtención de plantas resistentes contra patógenos como hongos, virus, bacterias y nematodos. Algunos de estos procedimientos emplean la reacción de hipersensibilidad (RH) de la planta, produciéndose la formación de necrosis en el punto de contacto directo entre patógeno y planta. A consecuencia de la RH, en las células vecinas se inicia un amplio espectro de medidas de defensa contra patógenos, las cuales impiden que continúe el avance del patógeno en el tejido vegetal.
- 15 La RH se puede producir tras la expresión de genes efectores, como por ejemplo genes de avirulencia de un patógeno y la interacción con el producto de un gen de resistencia correspondiente (gen R). Así, el gen R puede existir en la planta o se puede insertar en el correspondiente genoma vegetal mediante métodos de ingeniería genética (Stuiver y col. 1998, Keller y col., 1999, Belbahri y col., 2001). Además, una sobreexpresión o autoactivación de los genes R puede conducir a la activación de una RH (Tao y col., 2000, Tang y col., 1999, Bendahmane y col., 2002, Howles y col., 2005). Mediante la sobreexpresión de un gen R se sobrepasa un valor límite que conduce a la activación de una cascada de señales que normalmente sólo se desencadena por la presencia del patógeno o su producto del gen de avirulencia. Mediante la activación de esta cascada se puede obtener una resistencia de amplia eficacia contra patógenos (Oldroyd y Staskawicz, 1998, Tang y col., 1999, Tao y col., 2000, Howles y col., 2005). Como genes R autoactivos se describen aquellos genes R que se modificaron hasta el punto que para la activación de nuevo de la cascada de señales no es necesaria la presencia del patógeno/producto del gen de avirulencia y al mismo tiempo es suficiente una cantidad de expresión reducida en comparación con la forma no modificada para conseguir la activación de la cascada de señales.
- 20 Stuiver y col. (1998) pudieron mostrar que la transformación del gen *avr9* del hongo fitopatógeno *Cladosporium fulvum* bajo el control del promotor *Gst1* inducible por patógenos procedente de la patata en plantas de tomate que llevan el gen *Cf9* correspondiente condujo a una resistencia a los hongos de amplia eficacia. Se pudo obtener una resistencia contra el oomiceto *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* en *Nicotiana tabacum* después de que se transformara el inductor criptogeína de *P. cryptogea* o el inductor bacteriano *popA* de la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* en *N. tabacum*. Ambos genes estuvieron bajo el control del promotor inducible por patógenos *hsr203J* de *N. tabacum* (Keller y col., 1999, Belbahri y col., 2001).
- 35 El sistema de la activación de la RH requiere un control estricto de la expresión del gen efector en el lugar de la infección. En la expresión incontrolada, la expresión del gen efector provoca efectos negativos en el crecimiento de las plantas y por tanto en el rendimiento de plantas de cultivo (Stuiver y Custers, 2001). No obstante, se puede realizar una expresión controlada mediante la selección de promotores adecuados inducibles por patógenos. Estos no deberían permitir ninguna expresión o permitir sólo una expresión baja en condiciones sin ataque, aunque en caso de ataque inducen una expresión claramente mayor en el lugar de la infección. Tras la transformación de dos formas autoactivas diferentes del gen de resistencia a la roya L6 del lino (*Linum usitatissimum*) en lino bajo el control del promotor natural *Fis1* del lino inducible por roya se pudieron determinar dos fenotipos. Por un lado, las plantas de crecimiento normal que no mostraron ninguna resistencia mejorada contra patógenos, por otro lado las plantas de bajo crecimiento con amplia resistencia contra patógenos (Howles y col., 2005). Estos resultados muestran que según la forma empleada del gen R autoactivo se produce una actividad del promotor que se puede encontrar ya por encima del valor límite de inducción de la cascada de señales, mientras en las plantas fenotípicamente discretas la inducción del promotor *Fis1* no basta para conseguir el valor límite. Por tanto, la especificidad del promotor *Fis1* natural no es suficiente para conseguir una resistencia de amplia eficacia frente a patógenos sin efectos negativos en el crecimiento de la planta.
- 40 Los promotores naturales inducibles por patógenos muestran a menudo una actividad demasiado inespecífica y son activados por numerosos estímulos, de modo que su uso para la expresión de los genes efectores mencionados arriba no tiene sentido, ya que también se puede producir una activación RH bajo condiciones sin infección. Esta fuga de los promotores conduce a una afectación del crecimiento de la planta y por tanto a una reducción del rendimiento de la cosecha en plantas cultivadas. Por consiguiente, se han desarrollado promotores sintéticos que contienen motivos de secuencia (elementos reguladores cis) procedentes de promotores naturales inducibles por patógenos que son relevantes para la inducción por patógenos. Por el contrario, se eliminan los motivos de secuencia para otros estímulos. Los elementos reguladores cis se clonaron cadena arriba de un promotor mínimo, de modo que se consiguió un promotor funcional que presenta una elevada especificidad en comparación con los promotores naturales a partir de los cuales se aislaron los correspondientes elementos reguladores cis (Rushton y col., 2002). Como promotor mínimo para plantas dicotiledóneas se empleó la región -46 a +8 del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor. Además, se conoce el uso de un promotor mínimo a partir de un promotor natural, del que
- 55
- 60
- 65

se clonó el correspondiente elemento regulador cis (Perl-Treves y col., 2004). Para plantas monocotiledóneas se describe el uso del promotor mínimo del gen Act1 del arroz (Lü y col., 2000).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65 A este respecto, la expresión “homología” representa una homología de al menos el 70 % a nivel de ADN, la cual se puede determinar según procedimientos conocidos, por ejemplo las comparaciones de secuencias asistida por ordenador (Altschul, S. F. y col., 1990).

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

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

El motivo de secuencia twccmt se encuentra en orientación con sentido en la hebra codogénica entre la caja TATA y el punto de inicio de la transcripción y también puede presentarse dos o más veces. Las secuencias preferidas para los promotores mínimos se indican en las SEC. ID. N° 8 y 9.

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

Los elementos reguladores cis preferidos para la preparación de promotores sintéticos mediante el uso de los promotores mínimos según la invención se describen también en el documento WO 00/29592. De los elementos reguladores cis mencionados allí es adecuada sobre todo la caja D (SEC. ID. N° 10), en particular en la combinación 2xS/2xD (SEC. ID. N° 11), así como el elemento Gst1, en particular en la combinación 4xGst1 (SEC. ID. N° 12).

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

Cuando el elemento 4xS/2xD (SEC. ID. N° 14) se clonó delante del promotor mínimo (SEC. ID. N° 2), se pudo detectar un incremento promedio de la actividad del gen indicador en un factor de 2.892. En el elemento 2xGst1/2xD (SEC. ID. N° 15) se consiguió un incremento medio en un factor de 2.967 en comparación con el control.

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

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento para la obtención de una planta resistente contra patógenos, en el cual en una célula vegetal se introduce un gen apropiado para la producción de una defensa contra patógenos, el cual se encuentra bajo el control de un promotor sintético inducible por patógenos y a continuación a partir de esta célula vegetal se regenera una planta, caracterizado por que el promotor sintético inducible por patógenos es un promotor sintético inducible por patógenos como el descrito anteriormente.

Ejemplos

La Figura 1 muestra una comparación de secuencias entre los promotores mínimos preferidos para plantas dicotiledóneas (SEC. ID. N° 1 a 7) con las regiones TATA conservadas y los motivos dbmwa, así como los sitios de corte PstI y XhoI empleados para la clonación en el plásmido pMS23luc+.

La Figura 2 muestra una comparación de secuencias entre los promotores mínimos preferidos para plantas monocotiledóneas (SEC. ID. N° 8 y 9), que se emplearon para la transformación transitoria de hojas de trigo. Junto a la región TATA se representa el motivo de secuencia twccmt como región conservada.

Se pudo mostrar que los promotores mínimos StGst (SEC. ID. N° 6), NtTGAA (SEC. ID. N° 5), StPSBR (SEC. ID. N° 7), NpCABE (SEC. ID. N° 2), NtRBS (SEC. ID. N° 3), NpATP2 (SEC. ID. N° 1) y Nt5EAS (SEC. ID. N° 4) presentan una actividad claramente reducida (< 70 %) en comparación con el promotor mínimo 35S.

La Figura 3 muestra un resumen de las actividades promedio del gen indicador de plantas de patata transgénicas no infectadas con un promotor sintético compuesto por el elemento 4xGst1 (SEC. ID. N° 12) y los promotores mínimos indicados, clonado antes del gen de luciferasa de *Photinus pyralis* como gen indicador (URL = unidades de luz relativas). Líneas transgénicas estables con los promotores mínimos que llevan el motivo de secuencia dbmwa mostraron bajo condiciones de control una expresión claramente reducida del gen indicador en comparación con el promotor mínimo 35S. La actividad promedio más baja se alcanzó usando el promotor mínimo del gen NpATP2 (SEC. ID. N° 1). En estas plantas se pudo medir sólo el 9,7 % de la actividad promedio del promotor mínimo 35S.

Empleando los promotores mínimos StPSBR (SEC. ID. N° 7), NtTGAA (SEC. ID. N° 5) o StGst (SEC. ID. N° 6) se midió un 18 % de la actividad del promotor mínimo 35S, en el promotor mínimo NtRBS (SEC. ID. N° 3) un 26 %, en el promotor mínimo NpCABE (SEC. ID. N° 2) un 39 % y en el promotor mínimo Nt5EAS (SEC. ID. N° 4) un 41 %.

5 No es ningún problema para el especialista la obtención de construcciones apropiadas para la transformación de plantas con los promotores según la invención. Así, por ejemplo, se puede preparar el vector binario p4xGst1-luc-kan (Figura 8), que se empleó para la transformación estable de plantas de patata de la variedad "Baltica". Este vector es un derivado del vector binario pGPTV (Becker y col., 1992). El vector binario p4xGst1luc-kan lleva el gen de luciferasa de *Photinus pyralis* bajo el control del promotor sintético promotor mínimo 4xGst1:35S (Rushton y col., 2002). El plásmido contiene como secuencia de terminación el terminador del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*. El casete de expresión descrito se localiza en el ADN-T junto con un casete de expresión funcional para el gen de la neomicinfosotransferasa (nptII) como marcador de selección. La neomicinfosotransferasa confiere a las plantas transgénicas resistencia contra la kanamicina o la paromicina. Para intercambiar el promotor mínimo 35S por los promotores mínimos descritos anteriormente se dirigió el vector binario p4xGst1luc-kan con XhoI/Sall, de modo que se eliminó el promotor mínimo 35S, permaneciendo sin embargo el tetrámero del elemento Gst1. El punto de corte Sall se rellenó con ayuda del enzima polimerasa de Klenow y dNTP, para conseguir un extremo romo. Los promotores mínimos, clonados en el plásmido pMS23luc+, se cortaron mediante digestión con PdiI/XhoI y se ligaron en el vector binario y a continuación se transformaron en *E. coli*. Los vectores binarios con la nueva secuencia se transformaron (An, 1987) en la cepa de agrobacterias GV3101::pMP90 (Koncz y Schell, 1986) y se seleccionaron usando el antibiótico kanamicina (50 mg/l). Las agrobacterias transgénicas se emplearon para la transformación de patatas de la variedad "Baltica" (Dietze y col., 1995).

La figura 4 muestra un resumen de las inducciones obtenidas tras la infección *in vitro* de plantas de patata transgénicas estables con un promotor sintético compuesto por el elemento 4xGst1 (SEC. ID. N° 12) y los promotores mínimos indicados. La infección se produjo en plantas *in vitro* con una suspensión de zoosporas de *Phytophthora infestans*.

En diferentes momentos tras la inoculación se tomaron muestras de hojas de plantas *in vitro*, se determinó el peso de las muestras y se añadieron 10 volúmenes de tampón 1xCCLR (Promega, Mannheim). El material se homogeneizó en tampón sobre hielo con ayuda de un homogeneizador RW20 (IKA Labor Technik, Staufen). Mediante centrifugación a >10.000 x g durante 10 minutos se decantó el homogeneizado y 10 µl del sobrenadante se mezclaron con 50 µl de sustrato LAR (Promega, Mannheim) en un tubo de luminómetro y se determinó la emisión de luz como medida de la actividad de la luciferasa en un luminómetro (Sirius, Berthold Detection System GmbH, Pforzheim). Como comparación se emplearon plantas *in vitro* que habían crecido bajo las mismas condiciones y en lugar de zoosporas se trataron de forma simulada con agua. El valor medio de los cocientes de cinco líneas independientes de la actividad de luciferasa en la variante infectada respecto a la simulada indica la inducción del promotor sintético debido a la infección. Como se observa en la Fig. 7, mediante el uso del promotor mínimo 35S sólo se pudo obtener una inducción máxima de la actividad de luciferasa en un factor de diez 72 h tras la infección. Por el contrario, todos los promotores mínimos nuevos mostraron una inducción claramente mejorada. La inducción más fuerte tras la infección con un factor de 395 se consiguió 72 hpi con el promotor mínimo StPSBR (SEC. ID. N° 7). En general se pudo mejorar la inducción mediante el uso de los nuevos promotores mínimos en el instante 72 hpi desde el factor de 3,5 para el promotor mínimo StGst (SEC. ID. N° 6) hasta el factor de 39,5 para el promotor mínimo StPSBR (SEC. ID. N° 7) en comparación con el promotor mínimo 35S. Resulta interesante que entre los promotores mínimos hay claras diferencias en la cinética de inducción tras la inoculación del patógeno. Usando el promotor mínimo 35S se puede medir la inducción más clara 72 hpi, produciéndose esto también al usar los promotores mínimos StPSBR, NtTGAA, StGst, NtRBS y NpATP2. Por el contrario, en los promotores NpCABE y Nt5EAS ya se puede detectar una fuerte activación en el instante 9 hpi y la inducción perdura el resto del tiempo de ensayo casi al nivel alcanzado.

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

de la cinética del promotor sintético, de modo que la reacción al ataque de patógenos se produce antes, en comparación con los promotores sintéticos mediante el uso del promotor mínimo 35S.

La Figura 7 muestra la comparación de la actividad normalizada de promotores sintéticos inducibles por patógenos compuestos por el elemento 2xS/2xD (SEC. ID. N° 11) y los promotores mínimos ubi1 (promotor de comparación), TaPAL (SEC. ID. N° 9) y TaACS (SEC. ID. N° 8) tras transformación biolística en hojas primarias de la variedad de trigo "Taifun". Como se puede reconocer, los nuevos promotores mínimos TaPAL y TaACS en trigo tienen una reducida actividad de fondo en comparación con el promotor mínimo ubi1. Mientras que con el promotor mínimo ubi1 se pudo medir una actividad normalizada de 0,17, mediante el uso del promotor mínimo TaPAL ésta se pudo reducir a 0,072 y mediante el uso del promotor mínimo TaACS, a 0,13.

La Figura 9 muestra el plásmido pubiTATARucll, que contiene un ADNc con los genes de luciferasa de *Renilla reniformis*, como se encuentra en el plásmido comercial pRL-Null. El ADNc se encuentra bajo el control del promotor mínimo ubi1. El promotor mínimo ubi1 comprende la región de secuencia de -45 a +76 en relación con el punto de inicio de la transcripción. Para aumentar la intensidad de la expresión, el primer intrón del gen ubi1 está contenido en su contexto natural en el plásmido antes del gen indicador. El plásmido sirvió para la clonación del elemento regulador cis 2xS/2xD (SEC. ID. N° 11), para de este modo obtener un promotor sintético inducible por patógenos. El promotor mínimo ubi1 se intercambió por los nuevos promotores mínimos para mejorar las propiedades de los promotores sintéticos.

Referencias

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Protocolo de secuencias - texto libre

SEC. ID. Nº 13 elemento potenciador sintético compuesto por el dímero de la caja S y el tetrámero de la caja D

SEC. ID. Nº 14 combinación de elementos cis 4xS/2xD

20 SEC. ID. Nº 15 elemento potenciador sintético compuesto por el dímero de la caja *Gst1* y el dímero de la caja D

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> KWS SAAT AG
Schmidt, Klaus

<120> PROMOTOR MÍNIMO

30 <130> KWS 0111 PCT/EP/D1

<150> DE102006029129.8
<151> 22-06-2006

35 <150> EP07764382.3
<151> 16-06-2007

<150> PCT/DE2007/001075
<151> 16-06-2007

40 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1
<211> 69
<212> ADN
<213> *Nicotiana plumbaginifolia*

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(8)
<223> Secuencia de reconocimiento PstI

55 <220>
<221> TATA_signal
<222> (19)..(24)

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(37)
<223> DBRMWA

65 <220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(37)
<223> dbrmwa

ES 2 530 437 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (62)..(69)
 <223> Secuencia de reconocimiento XhoI
 5
 <400> 1

aactgcagtg ggctcttgat atatcagctc ttcacaaacc ctagcagtct ctttctctcc 60

tctcgagtt 69

 10
 <210> 2
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> *Nicotiana plumbaginifolia*

 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(8)
 <223> Secuencia de reconocimiento PstI

 20
 <220>
 <221> TATA_signal
 <222> (19)..(24)

 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(36)
 <223> DBRMWA

 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(36)
 <223> dbrmwa

 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (60)..(67)
 <223> Secuencia de reconocimiento XhoI

 40
 <400> 2

aactgcagta aagccattta tatacactta gtgcaaagcc catgaaactc aagcctcaac 60

tcgagtt 67

 45
 <210> 3
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> *Nicotiana tabacum*

 50
 <220>
 <221> Misc_feature
 <222> (1)..(8)
 <223> Secuencia de reconocimiento PstI

 55
 <220>
 <221> TATA_signal
 <222> (18)..(25)

 <220>
 <221> Misc_feature

ES 2 530 437 T3

<222> (33)..(38)
 <223> DBRMWA

 5 <220>
 <221> Misc_feature
 <222> (33)..(38)
 <223> dbrmwa

 10 <220>
 <221> Misc_feature
 <222> (60)..(67)
 <223> Secuencia de reconocimiento XhoI

 15 <400> 3
 aactgcagcc ttatcattat atataggggtg gtgggcaact atgcaatgac catattggac 60

 tcgagtt 67

 20 <210> 4
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> *Nicotiana tabacum*

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(8)
 <223> Secuencia de reconocimiento PstI

 30 <220>
 <221> TATA_signal
 <222> (24)..(31)

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(43)
 <223> DBRMWA

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (38)..(43)
 <223> dbrmwa

 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (62)..(69)
 <223> Secuencia de reconocimiento XhoI

 <400> 4
 aactgcagca gtttaatgta cattacatat aggttgcgga aaagtatata tatgctcaag 60

 actcgagtt 69

 50 <210> 5
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> *Nicotiana tabacum*

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(8)
 <223> Secuencia de reconocimiento PstI

ES 2 530 437 T3

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

5

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

10

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

15

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

20

<400> 5

aactgcagta aagccattta tatacactta gtgcaaagcc catgaaactc aagcctcaac 60

tcgagtt 67

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

<400> 6

aactgcagag tcaaataata tittatatta gaataattga atagtcaaac aagaaacttt 60

50

aacgagt 67

55

<210> 7
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 530 437 T3

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

5

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

10

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

15

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

20

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

<400> 7

aactgcagac catgcaaagt gaaaataaat aattcactact aagtagtgag agcaaagaag 60

25

aaaaaagctc gagtt 75

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

<400> 8

gcgccacgaa tctataaata ggcaccaacg agcagcttac ccattcatct ccctccctcc 60

ctccgccag 69

55

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

ES 2 530 437 T3

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

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (42)..(48)
 <223> Motivo TWCCCMT

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (42)..(48)
 <223> twcccmT

15

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

20

<400> 9

atctgcaggc gctgcctatt taatcccttc cctccctcc attccctcc aagaagagcc 60
 acagcttcat ctgcagctac agctcctctt cgtcttcgac acacaagtat tttttcagga 120
 caaagatcaa tccagataca catacacct 149

25

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

30

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

<400> 10
 tacaattcaa acattgtca aacaaggaac c 31

35

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

40

<220>
 <221> potenciador
 <222> (1)..(128)
 <223> Elemento potenciador sintético compuesto de dímero de la caja S y la caja D

45

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

50

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

55

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

ES 2 530 437 T3

<220>
 <221> potenciador
 <222> (98)..(128)
 <223> Caja D
 5
 <400> 11

 cagccaccaa acaggaccca gaattctagt cagccaccaa agaggaccca gaattctagt 60

 tacaattcaa acattgttca aacaaggaac ctctagttac aattcaaaca ttgttcaaac 120

 aaggaacc 128
 10
 <210> 12
 <211> 118
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*
 15
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (1)..(118)
 <223> Elemento potenciador sintético compuesto de un tetrámero del elemento Gst1
 20
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (1)..(25)
 <223> Caja Gst1
 25
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (32)..(56)
 <223> Caja Gst1
 30
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (63)..(87)
 <223> Caja Gst1
 35
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (94)..(118)
 <223> Caja Gst1
 40
 <400> 12

 ttctagccac cagatttgac caaactctag tttctagcca ccagatttga ccaaactcta 60

 gtttctagcc accagatttg accaaactct agtttctagc caccagattt gaccaaac 118

 <210> 13
 <211> 202
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Elemento potenciador sintético compuesto por el dímero de la caja S y el tetrámero de la caja D
 50
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (1)..(202)
 55
 <223> Elemento potenciador sintético compuesto por el dímero de la caja S y el tetrámero de la caja D

ES 2 530 437 T3

<220>
 <221> potenciador
 <222> (1)..(25)
 <223> Caja S
 5

<220>
 <221> potenciador
 <222> (31)..(55)
 <223> Caja S
 10

<220>
 <221> potenciador
 <222> (61)..(91)
 <223> Caja D
 15

<220>
 <221> potenciador
 <222> (98)..(128)
 <223> Caja D
 20

<220>
 <221> potenciador
 <222> (135)..(165)
 <223> Caja D
 25

<220>
 <221> potenciador
 <222> (172)..(202)
 <223> Caja D
 30

<400> 13

cagccaccaa agaggaccca gaattctagt cagccaccaa agaggaccca gaattctagt 60

tacaattcaa acattgttca aacaaggaac ctctagttac aattcaaca ttgttcaaac 120

aaggaacctc tagttacaat tcaaacattg ttcaacaag gaacctctag ttacaattca 180

aacattgttc aaacaaggaa cc 202

<210> 14
 <211> 188
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35

<220>
 <223> Combinación de elementos cis 4xS/2xD
 40

<220>
 <221> potenciador
 <222> (1)..(188)
 45

<220>
 <221> potenciador
 <222> (1)..(25)
 <223> Caja S
 50

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

ES 2 530 437 T3

<222> (61)..(85)
 <223> Caja S

5
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (91)..(115)
 <223> Caja S

10
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (121)..(151)
 <223> Caja D

15
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (158)..(188)
 <223> Caja D

20
 <400> 14

cagccaccaa agaggaccca gaattctagt cagccaccaa agaggaccca gaattctagt 60
 cagccaccaa agaggaccca gaattctagt cagccaccaa agaggaccca gaattctagt 120
 tacaattcaa acattgttca aacaaggaac ctctagttac aattcaaaca ttgttcaaac 180
 aaggaacc 188

25
 <210> 15
 <211> 130
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Elemento potenciador sintético compuesto por el dímero de la caja Gst1 y el dímero de la caja D

35
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (1)..(130)
 <223> Elemento potenciador sintético compuesto por el dímero de la caja Gst1 y el dímero de la caja D

40
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (1)..(25)
 <223> Caja Gst1

45
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (32)..(56)
 <223> Caja Gst1

50
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (63)..(93)
 <223> Caja D

55
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (100)..(130)
 <223> Caja D

ES 2 530 437 T3

<400> 15

ttctagccac cagatttgac caaactctag tttctagcca ccagatttga ccaaactcta 60

gttacaattc aaacattggt caaacaagga acctctagtt acaattcaaa cattgttcaa 120

acaaggaacc 130

REIVINDICACIONES

- 5 1. Promotor sintético inducible por patógenos que es apropiado para la regulación de la transcripción de un ácido nucleico y comprende un promotor mínimo, caracterizado por que
- 10 a) el promotor mínimo presenta un motivo de secuencia twcccmT dispuesto cadena abajo de una región TATA y delante de un punto de inicio de transcripción dispuesto sobre el promotor mínimo, en el que empieza la transcripción del ácido nucleico que se tiene que regular, apareciendo el motivo de secuencia en el promotor mínimo dos o varias veces y/o
- 15 b) el promotor mínimo presenta un motivo de secuencia twcccmT dispuesto cadena abajo de una región TATA y delante de un punto de inicio de transcripción dispuesto sobre el promotor mínimo, en el que empieza la transcripción del ácido nucleico que se tiene que regular, y en el que el promotor sintético inducible por patógenos presenta junto al promotor mínimo al menos un elemento regulador cis con una secuencia de nucleótidos según una de las SEC. ID. Nº: 10 – 15.
- 20 2. Promotor sintético inducible por patógenos según la reivindicación 1, en el que el promotor mínimo presenta una secuencia de nucleótidos según la SEC. ID. Nº 8 o la SEC. ID. Nº 9.
- 25 3. Promotor mínimo para la producción de un promotor sintético inducible por patógenos que es apropiado para la regulación de la transcripción de un ácido nucleico, caracterizado por que el promotor mínimo presenta un motivo de secuencia twcccmT dispuesto cadena abajo de una región TATA y delante de un punto de inicio de transcripción dispuesto sobre el promotor mínimo, en el que empieza la transcripción del ácido nucleico que se tiene que regular, apareciendo el motivo de secuencia en el promotor mínimo dos o varias veces.
- 30 4. Promotor mínimo de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que el promotor mínimo presenta una secuencia de nucleótidos según la SEC. ID. Nº 8 o la SEC. ID. Nº 9.
- 35 5. Gen recombinante con un promotor sintético inducible por patógenos según la reivindicación 1 o 2 o un promotor mínimo de acuerdo con la reivindicación 3 o 4.
- 40 6. Célula vegetal transgénica en la que un promotor sintético inducible por patógenos según la reivindicación 1 o 2 o un promotor mínimo de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 se ha integrado en el ADN de la célula vegetal.
7. Planta transgénica con una célula vegetal según la reivindicación 6.
8. Semilla transgénica con una célula vegetal según la reivindicación 6.
9. Procedimiento para la obtención de una planta resistente contra patógenos, en el cual en una célula vegetal se introduce un ácido nucleico apropiado para la producción de una defensa contra patógenos, el cual se encuentra bajo el control de un promotor sintético inducible por patógenos y a continuación a partir de esta célula vegetal se regenera una planta, caracterizado por que el promotor sintético inducible por patógenos es un promotor sintético inducible por patógenos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

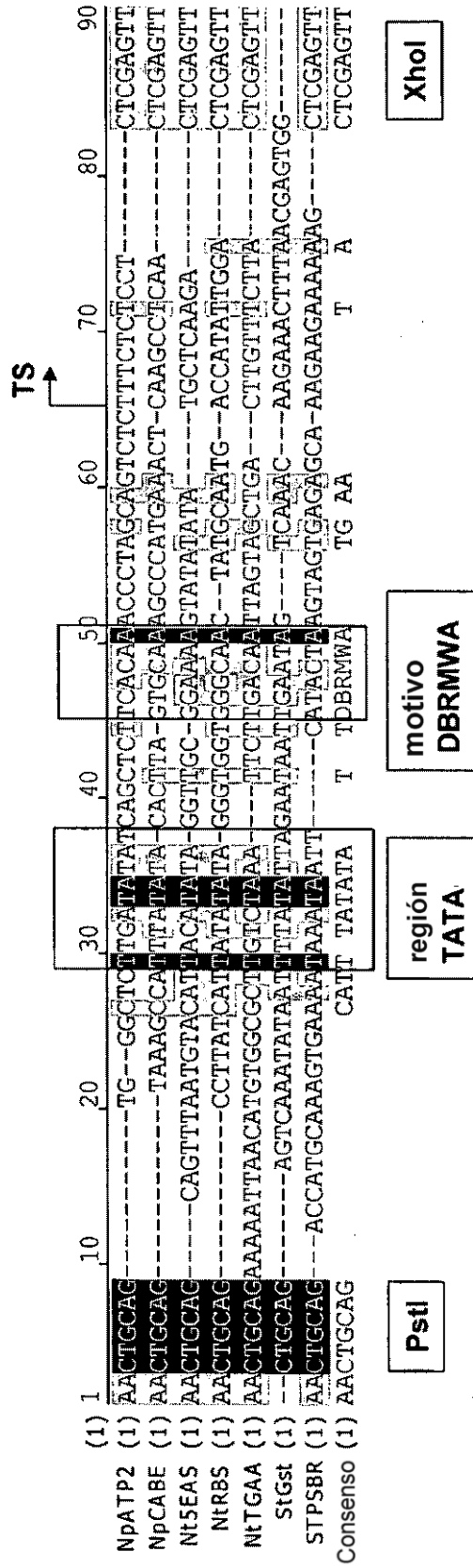


FIG. 1

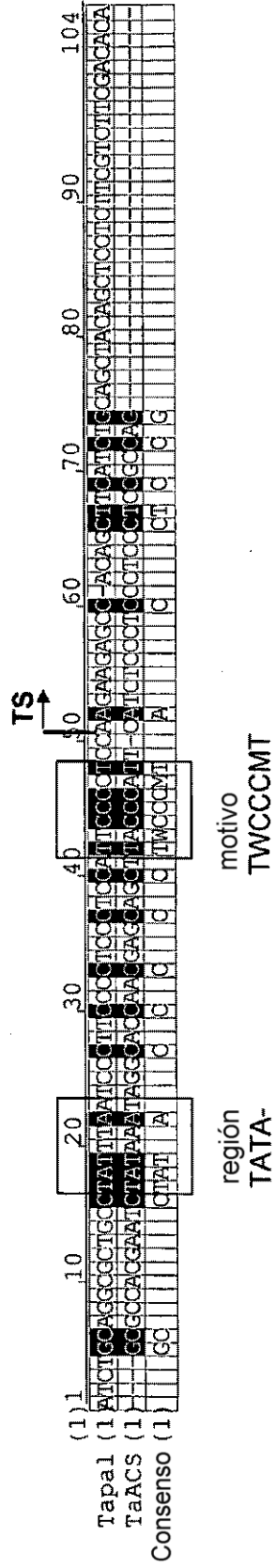


FIG. 2

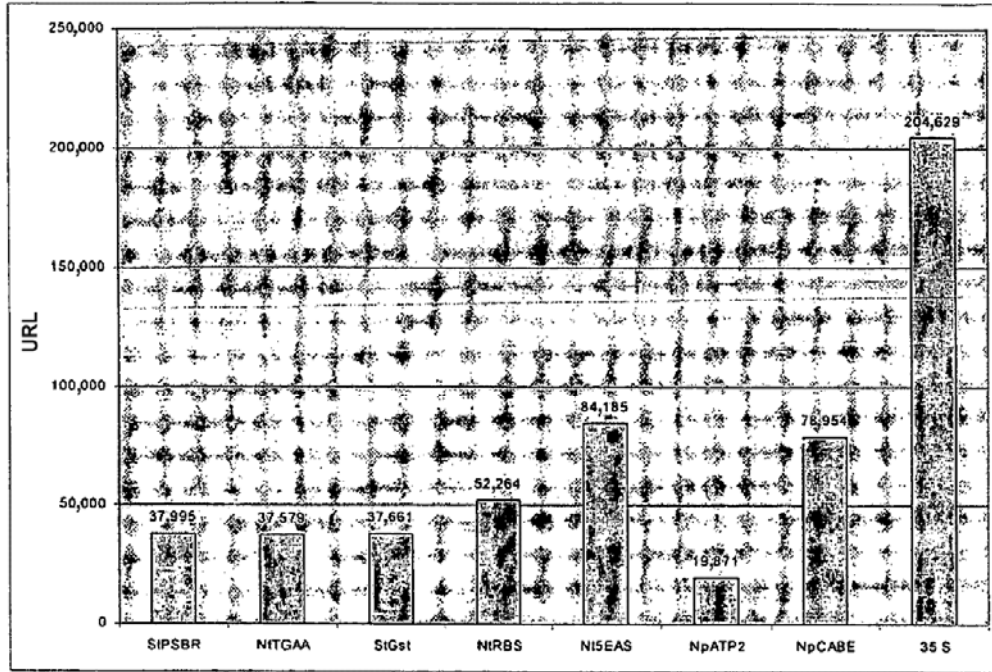


FIG. 3

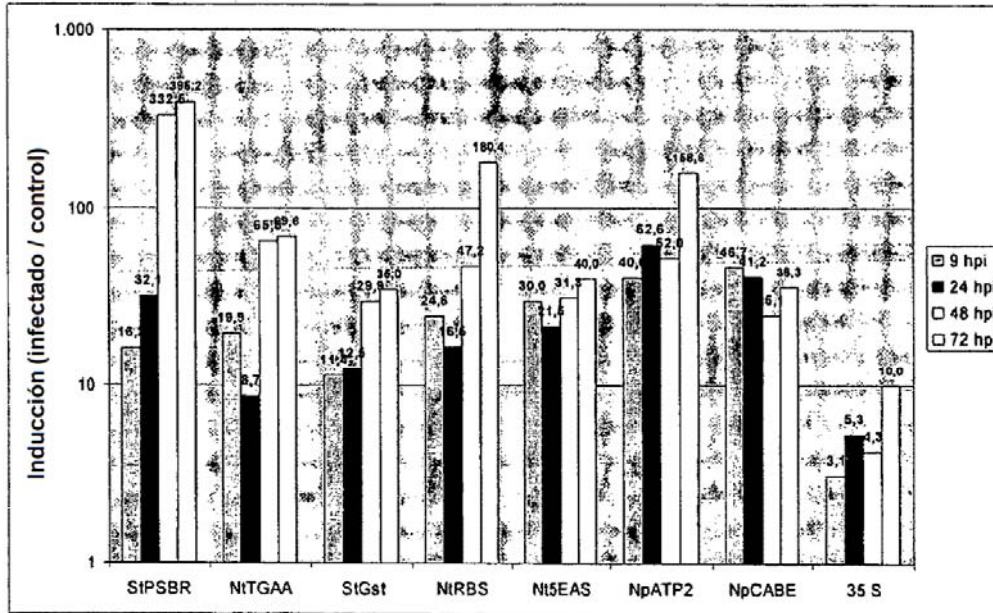


FIG. 4

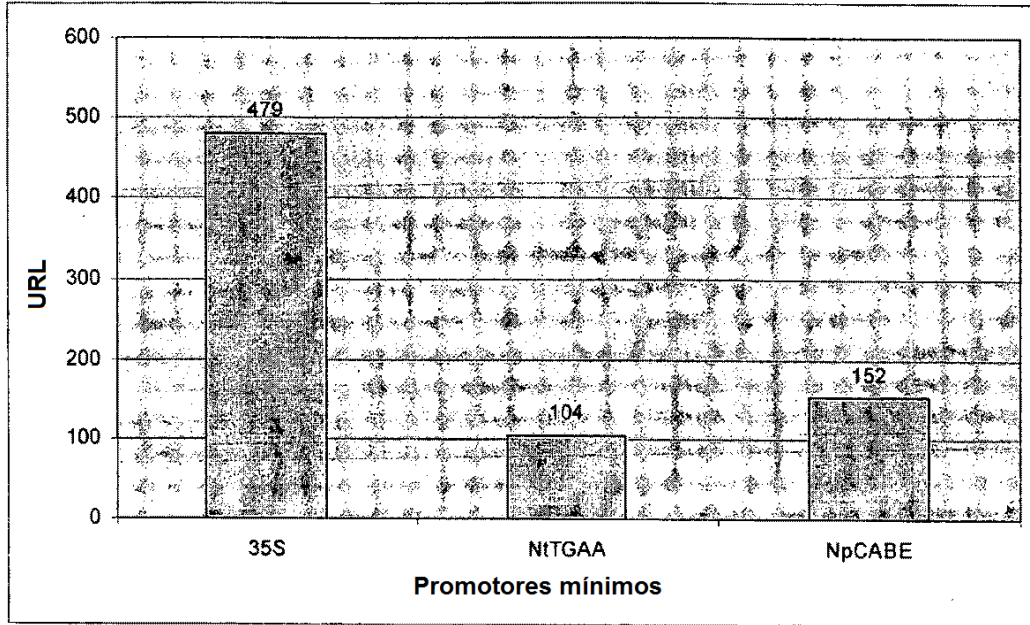


FIG. 5

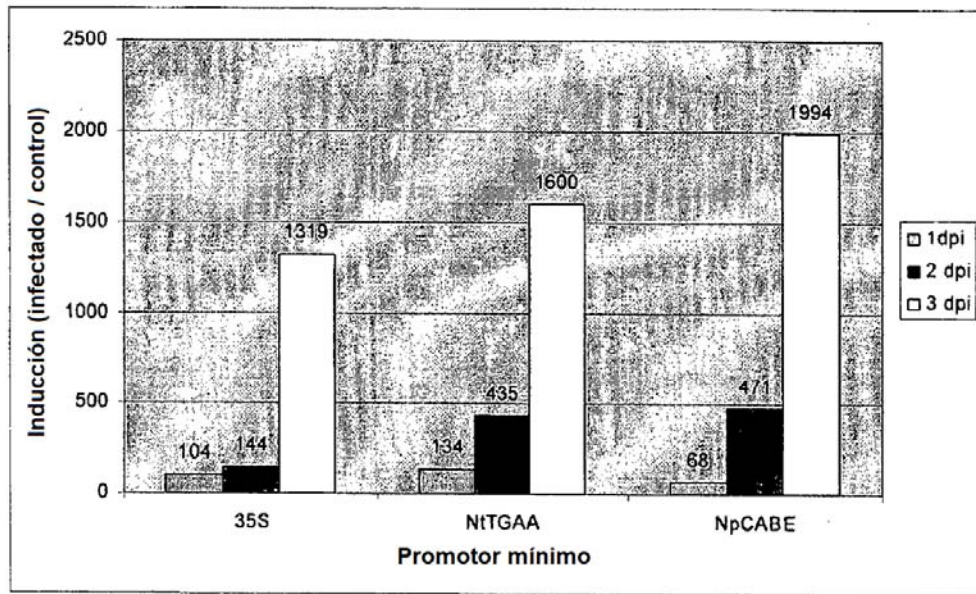


FIG. 6

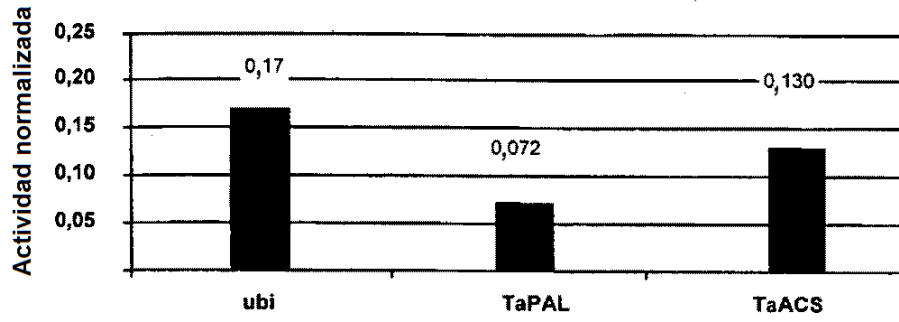


FIG. 7

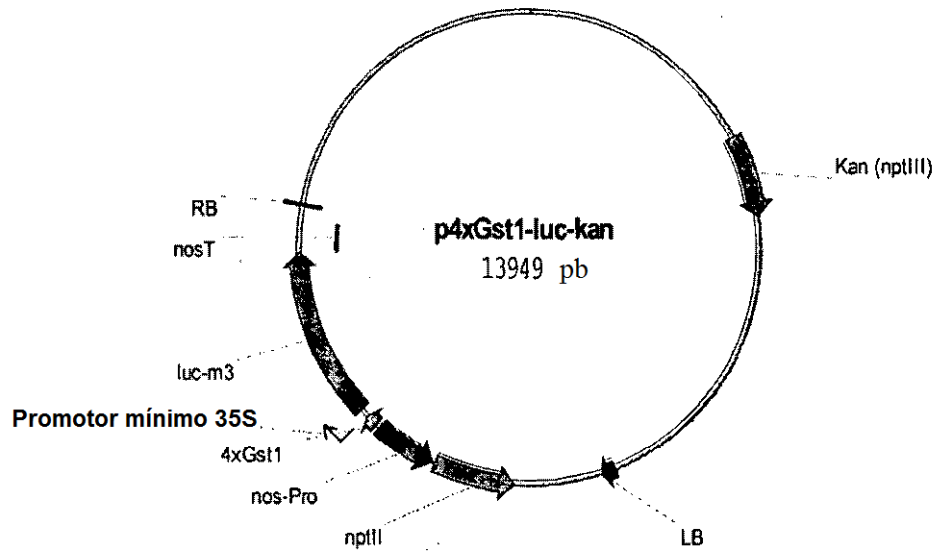


FIG. 8

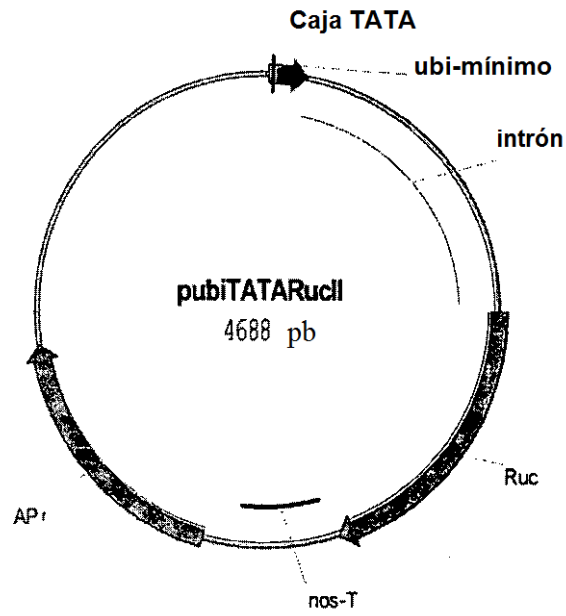


FIG. 9