



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0808370-3 A2



* B R P I 0 8 0 8 3 7 0 A 2 *

(22) Data de Depósito: 04/02/2008

(43) Data da Publicação: 19/08/2014
(RPI 2276)

(51) Int.Cl.:

C12N 15/29

C12N 15/82

A01H 5/00

(54) Título: PROMOTOR, CASSETE DE
EXPERESSÃO, PLANTA TRANSGÊNICA, E, MÉTODO
PARA CONFERIR OU APERFEIÇOAR RESISTÊNCIA
A NEMATÓDEO EM UMA PLANTA

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 06/02/2007 US 60/899693

(73) Titular(es): Basf Plant Science GMBH

(72) Inventor(es): Aaron Wiig, Robert Ascenzi, Rui-Guang Zhen,
Sumita Chaudhuri, Xiang Huang, Yu Han

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & Cia.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008051329 de
04/02/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/095888de
14/08/2008

“PROMOTOR, CASSETE DE EXPRESSÃO, PLANTA TRANSGÊNICA, E, MÉTODO PARA CONFERIR OU APERFEIÇOAR RESISTÊNCIA A NEMATÓDEO EM UMA PLANTA”

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

5 Este pedido reivindica o benefício de prioridade de pedido de patente internacional U.S. de número de série 60/899.693, depositado aos 6 de Fevereiro de 2007.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 Esta invenção refere-se ao promotor e aos seus fragmentos que regulam a transcrição do identificador At5g12170 de *Arabidopsis thaliana*. Os promotores da invenção são úteis para controlar transcrição de qualquer ácido nucleico de interesse em raízes de planta. Em particular, os promotores da invenção podem ser usados para controlar a transcrição de ácidos nucleicos codificadores de agentes que interrompem a formação ou a manutenção do

15 sítio de alimentação, interrompem o crescimento e/ou a reprodução de nematódeos parasitas de planta, que conferem ou melhoram resistência da planta aos nematódeos parasitas de planta, ou que são tóxicos para nematódeos parasitas de planta para reduzir destruição de plantação.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

20 Nematódeos são vermes arredondados microscópicos que se alimentam nas raízes, folhas, e caules de mais do que 2.000 plantações de escala, verduras/hortaliças, frutas, e plantas ornamentais, causando uma perda de plantação mundial estimada de 100 bilhões. Uma variedade de espécie de nematódeo parasita infecta plantas de colheita, incluindo nematódeo das

25 galhas (RKN), nematódeos formadores de cisto e de lesão. Nematódeos das galhas, que são caracterizados por causarem formação de galha de raiz em sítios de alimentação, têm uma variedade de hospedeiros relativamente ampla e são portanto patogênicos sobre um número grande de espécies de plantas de cultivo. As espécies de nematódeos formadores de cisto e de lesão têm uma

variedade de hospedeiros mais limitada, mas ainda causam perdas consideráveis em plantações suscetíveis.

5 Nematódeos patogênicos estão presentes em todos os Estados Unidos, com as concentrações maiores ocorrendo nas regiões quentes, úmidas do Sul e do Oeste e em solos arenosos. Nematódeo de cisto de feijão-soja (*Heterodera glycines*), a peste mais séria das plantas de feijão-soja, foi primeiro descoberto nos Estados Unidos na Carolina do Norte em 1954. Algumas áreas estão tão intensamente infestadas por nematódeo de cisto de feijão-soja (SCN) que a produção de feijão-soja não é mais economicamente
10 possível sem medidas de controle. Embora feijão-soja seja a plantação econômica principal atacada por SCN, parasitas SCN somam no total cinquenta hospedeiros, incluindo plantações de campo, verduras/hortaliças, plantas ornamentais, e ervas daninhas.

Sinais de dano de nematódeo incluem atrofiamento e
15 amarelecimento de folhas, e murchamento das plantas durante períodos quentes. Contudo, infestação de nematódeos pode causar perda de rendimento significativas sem quaisquer sintomas óbvios de doença acima do solo. As causas primárias de redução de rendimento são devido ao dano de raiz abaixo do solo. Raízes infectadas por SCN são nanicas ou atrofiadas. Infestação de
20 nematódeo também pode diminuir o número de nódulos fixadores de nitrogênio sobre as raízes, e podem tornar as raízes mais suscetíveis aos ataques por outros patógenos de planta provenientes do solo.

O ciclo de vida de nematódeo tem três estágios maiores: ovo, juvenil, e adulto. O ciclo de vida varia entre as espécies de nematódeos. O
25 ciclo de vida varia entre espécies de nematódeos. Por exemplo, o ciclo de vida de SCN pode costumeiramente ser completado em 24 a 30 dias sob condições ótimas enquanto que outras espécies podem demorar tão longamente quanto um ano, ou mais longo, para completar o ciclo de vida. Quando os níveis de temperatura e de umidade tornam-se favoráveis no verão, nematódeos juvenis

vermiformes eclodem de ovos no solo. Apenas nematódeos no estágio desenvolvimento juvenil são capazes de infectar raízes de feijão-soja.

O ciclo de vida de SCN tem sido submetido a muitos estudos, e como tal é um exemplo útil para entender um ciclo de vida de nematódeo.

5 Após penetrarem nas raízes de feijão-soja, nematódeos juvenis SCN movem-se através da raiz até contatarem tecido vascular, em cujo momento param de migrar e começam a se alimentar. Com um estilete, o nematódeo injeta secreções que modificam certas células da raiz e as transformam em sítios de alimentação especializados. As células de raiz são morfológicamente transformadas em sincícios multinucleados grandes (ou células gigantes no caso de RKN), que são usadas como uma fonte de nutrientes para os nematódeos. Os nematódeos ativamente se alimentando assim roubam nutrientes essenciais da planta resultando em perda de rendimento. À medida que os nematódeos fêmeas se alimentam, se incham e eventualmente se tornam tão grandes que seus corpos rompem o tecido da raiz e são expostos sobre a superfície da raiz.

Após um período de alimentação, nematódeos SCN machos, que não estão inchados como adultos, migram para fora da raiz para dentro do solo e fertilizam as fêmeas adultas aumentadas. Os machos então morrem, enquanto que as fêmeas permanecem fixadas no sistema de raiz e continuam a se alimentar. Os ovos nas fêmeas inchadas começam a se desenvolver, inicialmente em uma massa ou saco de ovos fora do corpo, então mais tarde dentro da cavidade corporal do nematódeo. Eventualmente a cavidade corporal inteira da fêmea adulta está cheia de ovos, e o nematódeo fêmea morre. É o corpo cheio de ovos da fêmea morta que é chamado de cisto. Cistos eventualmente se desalojam e são encontrados livres no solo. As paredes do cisto tornam-se muito resistentes, proporcionam excelente proteção para os aproximadamente 200 a 400 ovos contidos dentro das mesmas. Ovos de SCN sobrevivem dentro do cisto até ocorrerem condições

apropriadas de eclosão. Embora muitos dos ovos possam eclodir dentro do primeiro ano, muitos também sobreviverão dentro dos cistos por vários anos.

Um nematódeo pode se mover por si mesmo através do solo apenas umas poucas polegadas por ano. Contudo, infestação de nematódeo
5 pode ser espalhada por distâncias substanciais em uma variedade de maneiras. Qualquer coisa que possa mover solo infestado é capaz de espalhar a infestação, incluindo maquinário, veículos e ferramentas de fazenda, vento, água, animais, e trabalhadores de fazenda. Partículas de solo do tamanho de semente frequentemente contaminam semente colhida. Consequentemente,
10 infestação de nematódeo pode ser espalhada quando semente contaminada de campos infestados é plantada em campos não-infestados. Há até mesmo evidência de que certas espécies de nematódeos podem ser espalhadas por aves. Apenas algumas das causas podem ser prevenidas.

Práticas tradicionais para manejar infestação de nematódeo
15 incluem: manutenção de níveis de pH de solo e de nutrientes de solo apropriados em terra infestada com nematódeo; controle de outras doenças de planta, bem como de pestes de ervas daninhas e de insetos; usando práticas de sanitização tais com aração, plantio, e cultivo de campos infestados com nematódeos apenas após trabalhar campos não-infestados; limpeza cuidadosa
20 de equipamento com vapor de água ou água de pressão alta após trabalho em campos infestados; não uso de semente crescida em terra infestada para plantio de campos não-infestados a não ser que a semente tenha sido apropriadamente limpa; rotação de campos infestados e alternância de plantações hospedeiras com plantações não-hospedeiras; usando nematicidas;
25 e plantio de variedades de planta resistentes.

Têm sido propostos métodos para a transformação genética de plantas com o objetivo de conferir resistência aumentada aos nematódeos parasitas de plantas. Patentes U.S. Nos. 5.589.622 e 5.824.876 são direcionadas para a identificação de genes de planta expressados

especificamente em ou adjacientemente aos sítio de alimentação da planta após fixação pelo nematódeo. Patentes U.S. Nos. 5.589.622 e 5.824.876 revelam oito promotores isolados de raízes de batateira infectadas com *Globodera rostochiensis*. Nenhuns promotores induzíveis por nematódeo de outras espécies de planta são revelados. Estes promotores são intencionados para serem úteis para dirigir a expressão específica de enzimas ou proteínas tóxicas, ou a expressão de RNA de anti-senso para um gene alvo ou para genes celulares gerais.

Patente U.S. No. 5.023.179 revela um elemento intensificador de promotor designado ASF-1, isolado do promotor CaMV, que é intencionado para intensificar a expressão de gene de planta em raízes.

Patente U.S. No. 5.750.386 revela um fragmento de deleção do promotor específico para raiz RB7 de *Nicotiana tabacum*, que é intencionado para ser responsivo a nematódeo.

Patente U.S. No. 5.837.876 revela um promotor de gene específico para córtex de raiz isolado de tabaco e designado TobRD2.

Patente U.S. No. 5.866.777 revela uma abordagem de dois genes para retardar a formação de uma estrutura de alimentação de nematódeo. O primeiro gene, barnase, está sob o controle de um promotor que dirige a expressão pelo menos na estrutura de alimentação. O segundo gene, barstar (*Bacillus amyloliquefaciens*), está sob o controle de um promotor que dirige a expressão em todas as células de planta exceto a estrutura de alimentação. Promotores específicos para sítio de alimentação revelados em Patente U.S. No. 5.866.777 incluem versões truncadas dos promotores $\Delta 0.3$ TobRB7 e rolC.

Patente U.S. No. 5.955.646 revela regiões regulatórias quiméricas baseadas em promotores derivados dos genes de manopina sintase e octopina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*, que são intencionados para serem induzíveis por nematódeo.

Patente U.S. No. 6.005.092 revela o promotor de endo-1,4- β -glicanase de *N. tabacum* (Ntce17).

Patentes U.S. Nos. 6.262.344 e 6.395.963 revelam promotores isolados de *Arabidopsis thaliana*, que são intencionados para serem induzíveis por nematódeo.

Patente U.S. No. 6.448.471 revela um promotor de *A. thaliana*, que é específico para sítios de alimentação de nematódeo.

Patente U.S. No. 6.593.513 revela transformação de plantas com barnase sob controle do promotor do gene de endo-1,4- β -glicanase de *A. thaliana* (cell1) para produzir plantas capazes de interromperem o ataque de nematódeo.

Patente U.S. No. 6.703.541 revela clonagem e isolamento de gene P7X de peroxidase de milho e seu promotor. O promotor P7X de peroxidase de milho é intencionado para ser induzível por nematódeo.

Patente U.S. No. 6.906.241 revela o uso do promotor Ntce17 em combinação com um ácido nucleico heterólogo que codifica uma proteína inseticida ou nematocida.

Patente U.S. No. 7.078.589 revela clonagem e isolamento do promotor e do gene Pyk20 de feijão-soja, que são intencionados para serem induzidos pela infecção de SCN e mostram atividade forte em tecidos vasculares.

Patente U.S. No. 7.196.247 revela o promotor de isoflavona sintase I de feijão-soja, que é intencionado para ser específico para raiz e induzível em tecido vegetativo pelo ataque de parasita.

Patente U.S. No. 7.223.901 revela um promotor de fosforibosil-formil-glicinamidina ribonucleotídeo sintase de feijão-soja e seus fragmentos de deleção, que são intencionados para serem responsivos à infecção de nematódeo.

Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 2004/0078841

revela regiões de promotor dos promotores TUB-1, RPL16A, e ARSK1 de *Arabidopsis thaliana* e do promotor PSMTA de *Pisum sativum*, todas as quais são intencionadas para serem específicas para raiz.

Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 2004/0029167
5 revela uma sequência de promotor de um gene de O-metil-transferase de ácido cafeico de classe II do tabaco, que é intencionado para ser induzível em resposta à lesão mecânica ou química ou à agressão por um agente patogênico.

WO 94/10320 revela o fragmento de promotor $\Delta 0.3\text{TobRB7}$
10 do tabaco e seu uso com uma variedade de genes para expressão específica em célula de alimentação de nematódeo.

WO 03/033651 revela sequências sintéticas de promotor reguladas por nematódeo designadas SCP1.UCP3, e SUP.

WO 2004/029222 e sua contra-parte US Publicação de Patente
15 U.S. No. 2005/0070697 revelam regiões regulatórias dos genes de adenosina-5'-fosfato-desaminase e inositol-5-fosfatase de feijão-soja, para uso em aperfeiçoamento de resistência a nematódeo em plantas.

Nenhum dos promotores específicos para sítio de alimentação ou para raiz acima mencionados estão correntemente em uso em semente
20 comercial contendo um transgene anti-nematódeo. Embora a necessidade para tais produtos tenha sido longamente admitida, nenhum tem sido até agora bem sucedido no desenvolvimento de plantas resistentes a nematódeos através de tecnologia de DNA recombinante. Continua a existir necessidade de promotores específicos para sítio de alimentação de nematódeo e/ou
25 específicos para raiz para combinar com transgenes codificadores de agentes tóxicos para nematódeos parasitas de planta.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção fornece polinucleotídeos promotores adequados para uso em direção de expressão de um segundo polinucleotídeo em raízes

de planta que são suscetíveis ao ataque por nematódeos. Os polinucleotídeos promotores da invenção são particularmente úteis para tornar plantas de cultivo agrícola resistentes à infestação por nematódeos.

Em uma modalidade, a invenção fornece um promotor compreendendo um polinucleotídeo promotor isolado, capaz de mediar expressão induzível por nematódeo e/ou preferida em raiz, sendo que o polinucleotídeo promotor é selecionado do grupo consistindo de a) um polinucleotídeo tendo a sequência mostrada em SEQ ID NO:1; b) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 476 a 1476 de um polinucleotídeo tendo a sequência mostrada em SEQ ID NO:1; c) um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de sequência com o polinucleotídeo de a) ou b); d) um polinucleotídeo hibridizando sob condições e) um polinucleotídeo compreendendo um fragmento de pelo menos 50 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 100 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 200 nucleotídeos consecutivos de um polinucleotídeo tendo a sequência mostrada em SEQ ID NO:1

A invenção também se refere aos cassetes de expressão e às plantas transgênicas que compreendem os polinucleotídeos promotores isolados da invenção, e aos métodos de controlar infestações de nematódeos parasitas em plantações, sendo que os métodos empregam construtos de ácido nucleico recombinantes compreendendo os polinucleotídeos promotores isolados da invenção em associação operativa com um ácido nucleico que codifica um agente que interrompe metabolismo, crescimento, e/ou reprodução de nematódeos parasitas de planta, que confere ou aperfeiçoa a resistência da planta aos nematódeos parasitas de planta, ou que é tóxico para nematódeos parasitas de planta para reduzir destruição de plantações.

DESCRIÇÃO BREVE DOS DESENHOS

Figura 1: Sequência de polinucleotídeo promotor de locus

At5g12170 de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO:1).

Figura 2: Sequência de ácido nucleico de clone 50657480 de cDNA de *Glycine max* (SEQ ID NO:2).

Figura 3: Sequência de aminoácidos codificada por clone 50657480 de cDNA de *Glycine max* (SEQ ID NO:3) onde "*" indica o códon de terminação.

Figura 4: Dados de microarranjo de clone 50657480 de cDNA. O N em (N) denota o número de medições de microarranjo de cDNA e ND significa não-detectável sob condições experimentais descritas neste estudo. A designação "Raiz Não-tratada" significa aRNA (RNA amplificado) de tecido de raiz inteiro derivado de segmentos de raiz não-infectada de mesma idade que a dos segmentos inoculados com SCN. A designação "Não-Sincícios" significa aRNA de tecido de raiz inteiro derivado de raízes infectadas com SCN adjacentes à região infectada que não contém SCN ou sítios de alimentação. A designação "Sincícios" significa amostras de sincícios aRNA SCN obtidas usando microdissecação de captura por laser (LCM).

Figura 5: Sequência de aminoácidos codificada por gene At5g12170 de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 4) onde "*" indica o códon de terminação.

Figura 6: Alinhamento de sequência de aminoácidos codificada por cDNA clone 50657480 de feijão-soja (SEQ ID NO: 3) com sequência de aminoácidos codificada por gene At5g12170 de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 4).

Figura 7: Padrões de expressão de β -glicuronidase de vetor binário pAW280 no ensaio de raiz peluda de feijão-soja mostrado em Exemplo 4. Raízes peludas de feijão-soja infectadas por nematódeo e raízes peludas de feijão-soja não infectadas de controle foram coradas 12 dias após inoculação de SCN. O seguinte índice de escore foi usado: "-" para não

coloração GUS, "+" para coloração GUS fraca, "++" para coloração GUS forte, e "-/+" indica que aproximadamente 25% das linhagens testadas tiveram alguma coloração GUS vascular em <25% do tecido de raiz observado.

Figura 8: Padrões de expressão de β -glicuronidase de vetores binários pAW280, RTJ119, e RTJ120 o ensaio de raiz peluda de feijão-soja mostrado em Exemplo 7. Raízes peludas de feijão-soja infectadas com nematódeo de cisto e raízes peludas de feijão-soja não infectadas de controle foram coradas 12 dias após inoculação de SCN. O seguinte índice de escore foi usado: "-" para não coloração GUS, "+" para coloração GUS fraca, "++" para coloração GUS forte, e "-/+" indica que aproximadamente 25% das linhagens testadas tiveram alguma coloração GUS vascular em <25% do tecido de raiz observado.

Figura 9: Iniciador usado para clonar os polinucleotídeos promotores

DESCRIÇÃO DETALHADA DE MODALIDADES PREFERIDAS

A presente invenção pode ser entendida mais prontamente referindo-se à seguinte descrição detalhada das modalidades preferidas da invenção e dos exemplos aqui incluídos. A não ser que seja indicado de outra maneira, os termos aqui usados são para serem entendidos de acordo com o uso convencional por aquelas pessoas ordinariamente experientes na arte relevante. Em adição às definições de termos fornecidos abaixo, definições de termos comuns em biologia molecular também podem ser encontrados em Rieger et al., 1991 "Glossary of genetics: classical and molecular", 5th Ed., Berlin: Springer- Verlag; e em "Current Protocols in Molecular Biology", F.M. Ausubel et al., Eds., Current Protocols, um empreendimento conjunto entre Greene Publishing Associates, Inc. e John Wiley & Sons, Inc., (1998 Supplement).

É para ser entendido que como usado no relatório descritivo e nas reivindicações, "um" ou "uma" pode significar um ou mais, dependendo

do contexto no qual é usado. Assim, por exemplo, referência a "uma célula" pode significar que pelo menos uma célula pode ser utilizada. É para ser entendido que esta invenção não é limitada a ácidos nucleicos específicos, tipos de célula específicos, condições específicas, ou métodos específicos, etc., porque tais podem naturalmente variar, e numerosas modificações e variações nos mesmos serão evidentes para aquelas pessoas experientes na arte. É para ser também entendido que a terminologia aqui usada é apenas para o propósito de descrever modalidades específicas e não é intencionada para ser limitante.

Em todo este pedido, são feitas referências a várias publicações de patente e de literatura. As revelações de todas estas publicações e daquelas referências citadas dentro daquelas publicações em suas totalidades são por meio deste incorporados como referências neste pedido com o propósito de descrever mais completamente o estado da técnica ao qual esta invenção pertence. Técnicas padrão para clonagem, isolamento, amplificação e purificação de DNA, para reações enzimáticas envolvendo DNA ligase, DNA polimerase, endonucleases de restrição e semelhantes, e várias técnicas de separação são conhecidas e comumente utilizadas por aquelas pessoas experientes na arte. Numerosas técnicas padrão são descritas em Sambrook e Russell, "2001 Molecular Cloning, Third Edition, Cold Spring Harbor, Plainview, Nova Iorque; Sambrook et al., 1989 "Molecular Cloning", Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, Nova Iorque; Maniatis et al., 1982 "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, Nova Iorque; Wu (Ed.) 1993 Meth. Enzymol. 218, Part I; Wu (Ed.) 1979 Meth Enzymol. 68; Wu et al., (Eds.) 1983 Meth. Enzymol. 100 e 101; Grossman e Moldave (Eds.) 1980 Meth. Enzymol. 65; Miller (Ed.) 1972 "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nova Iorque; Old e Primrose, "1981 Principles of Gene Manipulation", University of California Press, Berkeley;

Schleif e Wensink, "1982 Practical Methods in Molecular Biology"; Glover (Ed.) "1985 DNA Cloning" Vol. I e II, IRL Press, Oxford, UK; Hames e Higgins (Eds.) "1985 Nucleic Acid Hybridization", IRL Press, Oxford, UK; e Setlow e Hollaender "1979 Genetic Engineering: Principles e Methods", Vols. 1-4, Plenum Press, Nova Iorque.

Os polinucleotídeos promotores de acordo com a presente invenção são fornecidos na forma isolada e/ou purificada a partir de seu ambiente natural, em forma substancialmente pura ou homogênea, ou livre ou substancialmente livre de outros ácidos nucleicos da espécie de origem. Um ácido nucleico "isolado" como aqui usado também está substancialmente livre - no momento de seu isolamento - de outros materiais celulares ou do meio de cultura quando produzidos por técnicas recombinantes, ou substancialmente livres de precursores químicos quando quimicamente sintetizados. Os polinucleotídeos promotores da invenção são ácidos nucleicos isolados. Onde aqui usado, o termo "isolado" inclui todas estas possibilidades.

O termo "cerca de" é aqui usado para significar aproximadamente, em torno de, ao redor de, ou nas regiões de. Quando o termo "cerca de" é usado conjuntamente com uma faixa numérica, ele modifica aquela faixa pela extensão dos limites acima e abaixo dos valores numéricos mostrados. Em geral, o termo "cerca de" é aqui usado para modificar um valor numérico acima e abaixo do valor indicado por uma variância de 10 por cento, para mais ou para menos (mais alto ou mais baixo).

O termo "promotor" ou polinucleotídeo promotor como aqui usado refere-se a uma sequência de DNA que, quando ligada em uma sequência de nucleotídeos de interesse, é capaz de controlar a transcrição da sequência de nucleotídeos de interesse em mRNA. Um promotor está tipicamente, embora não necessariamente, localizado 5' (e.g., a montante) de um nucleotídeo de interesse (e.g., próximo ao sítio de iniciação transcricional de um gene estrutural) cuja transcrição em mRNA ele controla, e fornece um

sítio para ligação específica por RNA polimerase e outros fatores de transcrição para iniciação de transcrição. Um "promotor constitutivo" refere-se a um promotor que é capaz de expressar a matriz de leitura aberta ou o elemento regulatório que ele controla em todos ou quase todos os tecidos de planta durante todos ou quase todos os estágios desenvolvendo da planta. "Promotor regulado" refere-se aos promotores que dirigem a expressão de gene não constitutivamente, mas em uma maneira temporal e/ou espacialmente, e inclui promotores tanto específicos para tecido quanto induzíveis. Promotores diferentes podem dirigir a expressão de um gene ou elemento regulatório em tipos de célula ou tecidos diferentes, ou em estágios de desenvolvimento diferentes, ou em resposta às condições ambientais diferentes. "Promotor específico para tecido" refere-se aos promotores regulados que não são expressados em todas as células de planta mas apenas em um ou mais tipos de célula em órgãos específicos (tais como folhas ou sementes), tecidos específicos (tais como embriões ou cotilédones), ou tipos de célula específicos (tais como parênquima foliar ou células de armazenagem de semente). "Promotor induzível" refere-se àqueles promotores regulados que podem ser ligados em um ou mais tipos de célula por um estímulo externo, tal como um agente químico, luz, hormônio, estresse, ou um patógeno.

O termo "resistência a nematódeo" como aqui usado refere-se à capacidade de uma planta para evitar infecção por nematódeos, para matar nematódeos ou para impedir, reduzir ou parar o desenvolvimento, o crescimento ou a multiplicação de nematódeos. Isto pode ser realizado por um processo ativo, e.g. pela produção de uma substância prejudicial ao nematódeo, ou por um processo passivo, e.g. por redução de nutrição para o nematódeo ou por inibição de desenvolvimento de estruturas induzidas pelo sítio de alimentação de nematódeo tais como células sinciciais ou células gigantes. O nível de resistência a nematódeo de uma planta pode ser determinado em várias maneiras, e.g. por contagem de nematódeos sendo

capazes de estabelecer parasitismo sobre aquela planta após infecção, ou por medição de estágios de desenvolvimento de nematódeo presentes em vários tempos após infecção, ou por medição de proporção de nematódeos machos e fêmeas ou do número de cistos ou ovos de nematódeo produzidos.

5 O termo "identidade de sequência" ou "identidade" no contexto de duas sequências de polinucleotídeo ou polipeptídeo faz referência àquelas posições nas duas sequências onde pares idênticos de símbolos caem juntos quando as sequências são alinhadas para correspondência máxima sobre uma janela de comparação especificada, por exemplo, quer a sequência
10 inteira como em um alinhamento global quer a região de similaridade em um alinhamento local. Quando percentagem de identidade de sequência é usada em referência aos polipeptídeos é reconhecido que as posições de resíduos que não são idênticos frequentemente diferem por substituições de aminoácido conservativas, onde resíduos de aminoácido substituem outros
15 resíduos de aminoácido com propriedades químicas similares (e.g., carga ou hidrofobicidade) e portanto não muda as propriedades funcionais da molécula. Quando sequências diferem em substituições conservativas, a identidade de sequência percentual pode ser ajustada para cima para corrigir a natureza conservativa da substituição. Sequências que diferem em tais substituições
20 conservativas são ditas em ter "similaridade de sequência" ou "similaridade". Meios para fazer este ajuste são bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte. Tipicamente isto envolve classificar uma substituição conservativa como uma combinação parcial em vez de uma má combinação, aumentando deste modo a percentagem de similaridade de sequência.

25 Como aqui usado, "percentagem de identidade de sequência" ou "identidade de sequência percentual" denota um valor determinado primeiro pela anotação em duas sequências otimamente alinhadas sobre uma janela de comparação, quer global quer localmente, em cada posição constituinte sobre se cada base de ácido nucleico idêntica ou resíduo de

aminoácido idêntico ocorrendo em ambas as sequências, denotou uma combinação, ou se não, denotou uma má combinação. Como dito alinhamento é construído por otimização do número de bases combinando, ao mesmo tempo que concorrentemente permite tanto as más combinações em qualquer
5 posição quanto a introdução de lacunas arbitrariamente dimensionadas, ou regiões vazias ou nulas onde necessário, aumenta deste modo a significância ou a qualidade do alinhamento, o cálculo determina o número total de posições para as quais existe condição de combinação, e então divide este número pelo número total de posições na janela de comparação, e finalmente
10 multiplica o resultado por 100 para dar a percentagem de identidade de sequência. "Percentagem de similaridade de sequência" para sequências de proteína pode ser calculada usando o mesmo princípio, no qual a substituição conservativa é calculada como uma má combinação parcial em vez de uma má combinação completa. Assim, por exemplo, onde um aminoácido idêntico
15 recebe um escore de 1 e uma substituição não-conservativa recebe um escore de zero, uma substituição conservativa recebe um escore entre zero e 1. O escore de substituições conservativas pode ser obtido das matrizes de aminoácido conhecidas na arte, por exemplo, matrizes Blosum ou PAM.

Métodos de alinhamento de sequências para comparação são
20 bem conhecidos na arte. A determinação de identidade percentual ou similaridade percentual (para proteínas) entre duas sequências pode ser realizada usando um algoritmo matemático. Exemplos preferidos, não-limitantes de tais algoritmos matemáticos são, o algoritmo de Myers e Miller (Bioinformatics, 4(1):11-17, 1988), o algoritmo global de Needleman-
25 Wunsch (J Mol Biol. 48(3):443-53, 1970), o algoritmo local de Smith-Waterman (J. Mol. Biol., 147:195-197, 1981), o método de pesquisa-de-similaridade de Pearson e Lipman (PNAS, 85(8): 2444-2448, 1988), o algoritmo de Karlin e Altschul (J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990; PNAS, 90:5873-5877,1993). Implementações computacionais destes algoritmos

matemáticas podem ser utilizadas para comparação de sequência para determinar identidade de sequência ou para identificar homólogos.

Pedido de Patente U.S. Comumente Cedido de Número de Série 60/899.739, depositado contemporaneamente com o Pedido de Patente U.S. de Número de Série 60/899,739, revela e reivindica o cDNA de feijão-soja designado GM50657480 representado aqui como SEQ ID NOs:2 e 3. Como mostrado em Exemplo 2, expressão de GM50657480 é supra-regulada em sincícios induzidos por SCN. Como mostrado em Figura 6, a sequência de aminoácidos de GM50657480 (SEQ ID NO:3) mostra alinhamento significativo com a sequência de aminoácidos de At5g12170 (SEQ ID NO:4), indicando que as duas proteínas são ortólogos. Como demonstrado em Exemplo 4, quando posto em associação operativa com um gene repórter GUS, o polinucleotídeo promotor de Arabidopsis da presente invenção (SEQ ID NO:1) é supra-regulado em raízes peludas de feijão-soja infectadas por nematódeos.

A invenção portanto é representada como modalidade em um polinucleotídeo promotor isolado tendo uma sequência como mostrada em SEQ ID NO:1, ou um fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo derivado de um polinucleotídeo promotor isolado tendo a sequência mostrada em SEQ ID NO:1 cujo fragmento é capaz de dirigir expressão específica para raiz e/ou induzível por nematódeo de um segundo polinucleotídeo. O termo "fragmento equivalente" ou "fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo" como aqui usado refere-se a um fragmento de um polinucleotídeo promotor que é capaz de mediar expressão induzível por nematódeo e/ou específica de raiz de um segundo polinucleotídeo. Fragmentos equivalentes de um polinucleotídeo promotor da invenção podem ser obtidos pela remoção de elementos funcionais não-essenciais sem deleção dos essenciais, e.g. sítios de ligação de fator de transcrição essencial. Diminuição da sequência de polinucleotídeo promotor para seus elementos funcionais, essenciais pode ser

realizada in vitro por mutações de deleção de tentativa-e-erro, ou in silico usando rotinas de pesquisa de elemento promotor. Regiões essenciais para atividade de promotor frequentemente demonstram agrupamentos de certos elementos promotores conhecidos. Tal análise pode ser realizada usando

5 algoritmos computacionais disponíveis tais como PLACE ("Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements"; Higo 1999), o "Transfac" do banco de dados BIOBASE (Biologische Datenbanken GmbH, Braunschweig; Wingender 2001) ou o bando de dados PlantCARE (Lescot 2002). Especialmente

10 preferidos são fragmentos equivalentes dos polinucleotídeos promotores, que são obtidos por deleção da região codificadora da região 5'-não-traduzida do mRNA, fornecendo assim a região de polinucleotídeo promotor (não-transcrita). A região 5'-não-traduzida pode ser facilmente determinada por métodos conhecidos na arte (tal como análise 5'-RACE). De maneira

15 conforme, alguns dos polinucleotídeos promotores da invenção são fragmentos equivalentes de outros polinucleotídeos promotores. Fragmentos de polinucleotídeo promotor mínimos específicos da invenção incluem, sem limitação, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 476 a 1476 de uma sequência como mostrada em SEQ ID NO:1, um polinucleotídeo compreendendo um fragmento de pelo menos 50 nucleotídeos consecutivos,

20 ou pelo menos 100 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 200 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 300 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 400 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 500 nucleotídeos consecutivos, de um polinucleotídeo promotor tendo a sequência mostrada em SEQ IDNO:1.

25 Alternativamente, o polinucleotídeo promotor da invenção compreende um polinucleotídeo isolado que hibridiza sob condições estridentes com um polinucleotídeo promotor tendo a sequência mostrada em SEQ ID N0:1, ou com um fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo derivado do polinucleotídeo promotor tendo a sequência mostrada em SEQ ID

NO:1. Condições de hibridização estringentes como aqui usadas são bem conhecidas, incluindo, por exemplo NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, hibridização a 60°C por 12-16 horas; seguida por lavagem em 0,1% SDS, 0,1% SSC a aproximadamente 65°C por cerca de 15-60 minutos.

5 A invenção é adicionalmente representada por modalidade em um polinucleotídeo isolado que hibridiza sob condições estringentes com um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 476 a 1476 de uma sequência como mostrada em SEQ ID NO:1, sendo que o polinucleotídeo promotor é capaz de dirigir a expressão induzível por nematódeo e/ou específica de raiz
10 de um segundo polinucleotídeo e é induzido em raízes de uma planta por nematódeos parasitas de planta. O polinucleotídeo promotor da invenção adicionalmente compreende um polinucleotídeo promotor isolado que é pelo menos 50-60%, ou pelo menos 60-70%, ou pelo menos 70-80%, 80-85%, 85%, 68%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, ou pelo menos
15 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou idêntico a um polinucleotídeo tendo uma sequência como mostrada em SEQ ID NO:1, ou um fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo derivado da sequência mostrada em SEQ ID NO:1, cujo polinucleotídeo promotor é capaz de dirigir a expressão induzível por nematódeo e/ou específica de raiz de um segundo
20 polinucleotídeo. O comprimento de comparação de sequências para polinucleotídeos é pelo menos 50 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 100 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 200 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 500 nucleotídeos consecutivos, até o comprimento total da sequência. No caso de duas sequências a serem comparadas não terem um
25 comprimento idêntico, o termo "o comprimento total da sequência" refere-se ao comprimento total da sequência mais curta.

Os métodos aqui revelados podem ser utilizados para isolar fragmentos de polinucleotídeo promotor mínimos de SEQ ID NO:1 que são capazes de mediar expressão induzível por nematódeo e/ou específica de raiz

de um segundo polinucleotídeo. A invenção adicionalmente se apresenta como modalidades de "variantes" ou "derivados" dos polinucleotídeos promotores da invenção. Derivados das sequências específicas de polinucleotídeo promotor e seus elementos específicos podem incluir, mas não são limitados a, deleções de sequência, mutações pontuais únicas ou múltiplas, alterações em um sítio de enzima de restrição particular, adição de elementos funcionais, ou outros meios de modificação molecular. Esta modificação pode ou não intensificar, ou diferentemente alterar a atividade reguladora de transcrição de dito polinucleotídeo promotor. For exemplo, uma pessoa experiente na arte pode delimitar os elementos funcionais e.g. elementos promotores como, mas não limitados a, sítios de ligação de fator de transcrição, dentro dos polinucleotídeos promotores e deletar quaisquer elementos funcionais não-essenciais. Elementos funcionais podem ser modificados ou combinados para aumentar a utilidade ou o nível de expressão dos polinucleotídeos promotores da invenção para qualquer aplicação particular.

Como indicado acima, mutantes de deleção do polinucleotídeo promotor da invenção também podem ser aleatoriamente preparados e então ensaiados. Com esta estratégia, uma série de construtos é preparada, cada construto contendo uma porção diferente do polinucleotídeo promotor (um subclone), e estes construtos são então selecionados para atividade. Um meio adequado para triagem para atividade é ligar um construto de polinucleotídeo promotor, que contém um fragmento de polinucleotídeo promotor em um marcador detectável ou selecionável, e isolar apenas aquelas células expressando o gene marcador. Nesta maneira, são identificados numerosos construtos de polinucleotídeo promotor deletados, diferentes que ainda retêm a atividade desejada, ou mesmo intensificada. O fragmento de polinucleotídeo promotor menor, que é exigido para atividade, é deste modo identificado através de comparação dos construtos selecionados. Este fragmento de

polinucleotídeo promotor pode ser então usado para construção de vetores para a expressão de um segundo polinucleotídeo e.g. codificação de genes exógenos.

Os meios para mutageneizar ou criar deleções em um polinucleotídeo e.g. um polinucleotídeo promotor são bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte e são revelados, for exemplo, em US 6.583.338, aqui incorporada em sua totalidade como referência. Um exemplo de uma variante de sequência regulatória é um polinucleotídeo promotor formado por uma ou mais deleções de um polinucleotídeo promotor maior. A porção 5' de um polinucleotídeo promotor até o box TATA próximo do sítio de iniciação de transcrição pode algumas vezes ser deletada sem eliminar a atividade do promotor, como descrito por Zhu et al., (1995) *The Plant Cell* 7:1681-1689. Uma maneira rotineira para remover parte de um polinucleotídeo é o uso de uma exonuclease em combinação com amplificação de DNA para produzir deleções aninhadas unidirecionais de clones de DNA de fita dupla. Um kit comercial para este propósito é vendido sob o nome comercial Exo-Size™ (New England Biolabs, Beverly, Mass.). Variantes biologicamente ativas também incluem, por exemplo, os polinucleotídeos promotores nativos da invenção tendo uma ou mais substituições, deleções ou inserções de nucleotídeo.

Derivados e variantes também incluem homólogos, parólogos e ortólogos de outras espécies, tais como mas não limitadas a, bactérias, fungos, e plantas. "Homólogo" é um termo genérico usado na arte para indicar uma sequência de polinucleotídeo ou de polipeptídeo possuindo um grau alto de parentesco de sequência com uma sequência de referência. Tal parentesco pode ser quantificado pela determinação do grau de identidade e/ou similaridade entre as duas sequências como definido aqui anteriormente. Caindo dentro deste termo genérico estão os termos "ortólogo", e "parólogo". "Parólogo" refere-se a um polinucleotídeo ou polipeptídeo que dentro da

mesma espécie é funcionalmente similar. "Ortólogo" refere-se a um polinucleotídeo ou polipeptídeo que é equivalente funcional ao polinucleotídeo ou polipeptídeo de outra espécie. Um gene ortólogo significa preferivelmente um gene, que codifica uma proteína ortóloga. Mais especificamente, o termo "ortólogo" denota um polipeptídeo ou uma proteína obtido(a) de uma espécie que é a contra-parte funcional de um polipeptídeo ou uma proteína de uma espécie diferente. Diferenças de sequência dentre ortólogos são o resultado de especiação.

Como aqui usado, o termo "variante alélica" refere-se a um polinucleotídeo contendo polimorfismos que ocasionam mudanças nos nucleotídeos do polinucleotídeo e que existe dentro de uma população natural (e.g., uma espécie ou variedade de planta). Tais variações alélicas naturais podem tipicamente resultar em 1-5% de variância em um polinucleotídeo codificador de uma proteína, ou 1-5% de variância na proteína codificada. O termo "variante alélica" também se refere a um polinucleotídeo promotor contendo polimorfismos que causam mudanças na sequência de polinucleotídeo de um polinucleotídeo promotor e que existe dentro de uma população natural. Tais variações alélicas podem tipicamente resultar em 1-5% de variância em um polinucleotídeo, ou 1-5% de variância na proteína codificada. Variantes alélicas podem ser identificadas por sequenciamento do polinucleotídeo de interesse em numerosas plantas diferentes, que pode ser prontamente realizada pelo uso, por exemplo, de sondas de hibridização para identificar o mesmo polinucleotídeo promotor, gene ou locus genético naquelas plantas. Qualquer e todas tais variações de ácido nucleico em um polinucleotídeo promotor, que são o resultado de variação alélica natural e não alteram a atividade funcional do polinucleotídeo promotor são intencionadas para estarem dentro do escopo da invenção. Variantes alélicas de um gene podem ser usadas para clonar variantes dos polinucleotídeos promotores da invenção. Uma variante de um polinucleotídeo promotor da

invenção obtida por este modo pode ser pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idêntica à sequência de SEQ ID NO: 1 ou à sequência de nucleotídeos 476 a 1476 de SEQ ID NO:1 e são naturalmente conectadas em um gene codificador de um polipeptídeo sendo pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idêntico a uma sequência como descrita por SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4. Naturalmente conectado significa que ambos os polinucleotídeos são parte de um polinucleotídeo contínuo ocorrendo na natureza, e.g. em um genoma de planta, sendo que o segmento de polinucleotídeo conectando ambas as sequências não é mais longo do que 3000 pb, 2000 pb, 1000 pb, 500 pb, 200 pb, 100 pb ou 50 pb. Preferivelmente a variante de um polinucleotídeo promotor da invenção está na região a montante de um gene ortólogo codificador de um polipeptídeo tendo pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade com a sequência como to a sequência como descrita por SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4.

De acordo com a invenção, os polinucleotídeos promotores isolados da presente invenção podem ser postos em associação operativa com um segundo polinucleotídeo para expressão induzível por nematódeo e/ou específica de raiz do segundo polinucleotídeo em plantas com o objetivo de variar o fenótipo daquela planta. Como aqui usados, os termos "em associação operativa", "operacionalmente ligado", e "associado com" são intercambiáveis e significam a ligação funcional de um promotor e um segundo polinucleotídeo em um único fragmento de polinucleotídeo em uma tal maneira que a transcrição do segundo polinucleotídeo é iniciada e mediada pelo promotor. Em geral, os ácidos nucleicos que estão em associação operativa são contíguos.

Qualquer segundo polinucleotídeo pode ser posto em associação operativa com os polinucleotídeos promotores da invenção para realizar a expressão induzível por patógeno ou específica para raiz do segundo polinucleotídeo. Os segundos polinucleotídeos incluem, por

exemplo, uma matriz de leitura aberta, uma porção de uma matriz de leitura aberta, um polinucleotídeo codificador de uma proteína de fusão, uma sequência de anti-senso, uma sequência codificadora de uma sequência de RNA de fita dupla, um transgene, e semelhantes. O segundo polinucleotídeo

5 pode codificar um gene de resistência a inseto, um gene de resistência à doença bacteriana, um gene de resistência à doença fúngica, um gene de resistência à doença viral, um gene de resistência à doença de nematódeo, um gene de resistência a herbicida, um gene afetando composição e qualidade de grão, um gene de utilização de nutriente, um gene marcador selecionável

10 negativo, um gene marcador selecionável positivo, um gene afetando características agronômicas de planta (i.e. rendimento), um gene de resistência ao estresse ambiental (como exemplificado por genes que conferem resistência ou tolerância à estiagem, ao calor, ao frio, ao congelamento, à umidade excessiva, ao estresse salino, ou ao estresse

15 oxidativo), genes que aperfeiçoam qualidade ou propriedades de amido, qualidade e quantidade de óleo, composição de aminoácidos ou de proteína, e semelhantes. Preferivelmente, o segundo polinucleotídeo codifica um RNA, preferivelmente um RNA de fita dupla (dsRNA) ou um RNA de anti-senso, a siRNA, um miRNA ou seu precursor, e semelhantes.

20 Preferivelmente, o segundo polinucleotídeo codifica um RNA, preferivelmente um RNA de fita dupla (dsRNA), que é substancialmente idêntico ou homólogo no todo ou em parte a um gene de planta ou um promotor de planta exigido para formação ou manutenção de um sítio de alimentação de nematódeo e.g. por destruição ou impedimento do

25 desenvolvimento ou da integridade de sincícios ou células gigantes. Em uma modalidade o segundo polinucleotídeo codifica um dsRNA, um RNA de anti-senso, um siRNA, um miRNA que é complementar a um promotor de planta e causa infra-regulação do promotor de planta. O segundo polinucleotídeo pode alternativamente codificar um agente, e.g. uma proteína, um dsRNA, um

RNA de anti-senso, um siRNA, um miRNA ou seu precursor, que interrompe ou impede o crescimento e/ou a reprodução de nematódeos parasitas de planta, que confere ou aperfeiçoa resistência da planta a nematódeos parasitas de planta, ou que é tóxico para nematódeos parasitas de planta para reduzir destruição de plantação. Qualquer polinucleotídeo codificador de um agente que interrompe o crescimento e/ou a reprodução de nematódeos parasitas de planta, que confere ou aperfeiçoa a resistência da planta aos nematódeos parasitas de planta, ou que é tóxico para nematódeos parasitas de planta pode ser utilizado de acordo com a invenção. Por exemplo, o segundo polinucleotídeo pode codificar um RNA de fita dupla que é substancialmente idêntico a um gene alvo de um nematódeo parasita de planta que é essencial para o metabolismo, a sobrevivência, a metamorfose, ou a reprodução do nematódeo. O segundo polinucleotídeo pode alternativamente codificar um RNA de fita dupla que é substancialmente idêntico a um gene de planta nos sítios de alimentação de raízes de planta que é essencial para a sobrevivência, o crescimento ou a fertilidade do nematódeo.

Como aqui usados, levando-se em consideração a substituição de timina por uracila quando se comparam sequências de RNA e DNA, os termos "substancialmente idêntico" e "correspondendo a" significam que a sequência de nucleotídeos de uma fita do dsRNA é pelo menos cerca de 80%-90% idêntica a 20 ou mais nucleotídeos contíguos do gene alvo, mais preferivelmente, pelo menos cerca de 90-95% idêntica a 20 ou mais nucleotídeos contíguos do gene alvo, e muito mais preferivelmente pelo menos cerca de 95-99% idêntica ou absolutamente idêntica a 20 ou mais nucleotídeos contíguos do gene alvo. Genes alvos de nematódeo parasita de planta exemplares são mostrados, por exemplo, em Publicação de Pedido de Patente U.S. comumente cedido de No. 2005/188438, aqui incorporada como referência. Alternativamente, para controle de nematódeo, o segundo polinucleotídeo posto em associação operativa com os polinucleotídeos

promotores da invenção pode codificar uma matriz de leitura aberta, preferivelmente um gene codificador de proteína. Por exemplo o segundo polinucleotídeo pode codificar qualquer matriz de leitura aberta de qualquer espécie. Exemplos não limitantes são matrizes de leitura aberta de uma

5 espécie *Glycine*, *Arabidopsis*, *Medicago*, *Escherichia*, *Baccillus*, *Rhizobium* ou *Saccharomyces*. Por exemplo, o segundo ácido nucleico pode codificar um gene de resistência a inseto, um gene de resistência à doença bacteriana, um gene de resistência à doença fúngica, um gene de resistência à doença viral, um gene de resistência à doença de nematódeo, um gene de resistência a

10 herbicida, um gene afetando composição e qualidade de grão, um gene de utilização de nutriente, um gene de redução de micotoxina, um gene de esterilidade masculina, um gene marcador selecionável, um gene marcador detectável, um gene marcador selecionável negativo, um gene marcador selecionável positivo, um gene afetando características agronômicas de planta

15 (i.e. rendimento), um gene de resistência ao estresse ambiental (como exemplificado por genes que conferem resistência ou tolerância à estiagem, ao calor, ao frio, ao congelamento, à umidade excessiva, ao estresse salino, ou ao estresse oxidativo), genes que aperfeiçoam qualidade ou propriedades de amido, qualidade e quantidade de óleo, composição de aminoácidos ou de

20 proteína, e semelhantes. Em uma modalidade a matriz de leitura aberta codifica uma proteína que quando sobre-expressada no sítio de alimentação resulta em resistência a nematódeo aumentada. O mecanismo molecular de resistência a nematódeo pode variar dependendo da estratégia particular. Como um exemplo, resistência a nematódeo aumentada pode ser alcançada

25 por sobre-expressão de um gene que é tóxico para um nematódeo, que interrompe a formação e/ou manutenção do sítio de alimentação de nematódeo, modifica a disponibilidade ou liberação de nutrientes para o nematódeo, aumenta a resposta de defesa da planta, ou é em qualquer maneira prejudicial para a reprodução do nematódeo. Em outra modalidade o gene

codifica uma proteína tóxica para nematódeo. Por exemplo, polinucleotídeos codificadores de toxinas microbianas ou seus fragmentos, derivados de insetos tais como aqueles descritos em Patentes U.S. Nos. 5.457.178; 5.695.954; 5.763.568; 5.959.182; e semelhantes, são úteis nesta modalidade da invenção.

Plantas de cultivo e nematódeos patogênicos correspondentes são listados no "Index of Plant Diseases in the United States" (U.S. Dept. of Agriculture Handbook No. 165, 1960); "Distribution of Plant-Parasitic Nematode Species in North America" (Society of Nematologists, 1985); e "Fungi on Plants and Plant Products in the United States" (American Phytopathological Society, 1989). Por exemplo, nematódeos parasitas de planta que são selecionados pela presente invenção incluem, sem limitação, nematódeos de cisto e nematódeos das galhas. Nematódeos parasitas de planta específicos que são selecionados pela presente invenção incluem, sem limitação, *Heterodera glycines*, *Heterodera schachtii*, *Heterodera a venae*, *Heterodera oryzae*, *Heterodera cajani*, *Heterodera trifolii*, *Heterodera zea*, *Globodera pallida*, *Globodera rostochiensis*, *Globodera tabacum*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne naasi*, *Meloidogyne 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 a venae*, *Subanguina radicola*, *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*,

Cacopauruspestis, e semelhantes.

Em uma modalidade, os nematódeos selecionados pertencem às famílias de nematódeo induzindo células gigantes ou sinciciais. Nematódeos indutores de células gigantes ou sinciciais pertencem às famílias
 5 Longidoridae, Trichodoridae, Heterodidae, Meloidogynidae, Pratylenchidae ou Tylenchulidae. Em particular às famílias Heterodidae e Meloidogynidae.

De maneira conforme, em outra modalidade os nematódeos selecionados pertencem a um ou mais gêneros selecionados do grupo de Nacobus, Cactodera, Dolichodera, Globodera, Heterodera, Punctodera,
 10 Longidorus ou Meloidogyne. Em uma modalidade preferida os nematódeos selecionados pertencem a um ou mais gêneros selecionados do grupo de Nacobus, Cactodera, Dolichodera, Globodera, Heterodera, Punctodera ou Meloidogyne. Em uma modalidade mais preferida os nematódeos selecionados pertencem a um ou mais gêneros selecionados do grupo de
 15 Globodera, Heterodera, ou Meloidogyne. Em uma modalidade ainda mais preferida os nematódeos selecionados pertencem a um ou mais gêneros selecionados do grupo de Globodera ou Heterodera. Em outra modalidade os nematódeos selecionados pertencem ao gênero Meloidogyne.

Quando os nematódeos selecionados são do gênero Globodera,
 20 a espécie selecionada pode ser escolhida do grupo consistindo de *G. achilleae*, *G. artemisiae*, *G. hypolysi*, *G. mexicana*, *G. millefolii*, *G. mali*, *G. pallida*, *G. rostochiensis*, *G. Tabacum*, e *G. virginiae*. Em uma modalidade preferida o nematódeo Globodera selecionado inclui pelo menos uma das espécies *G. pallida*, *G. tabacum*, ou *G. rostochiensis*. Quando o nematódeo selecionado é
 25 do gênero Heterodera, a espécie pode ser selecionada do grupo consistindo 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* e *H. zae*. Em uma modalidade preferida os nematódeos Heterodera selecionados incluem pelo menos uma das espécies *H. glycines*, *H. avenae*, *H. cajani*, *H. gottingiana*, *H. trifolii*, *H. zae* ou *H. schachtii*. Em uma modalidade mais preferida os nematódeos selecionados incluem pelo menos uma das espécies *H. glycines* ou *H. schachtii*. Em uma modalidade mais preferida o nematódeo selecionado é a espécie *H. glycines*.

Quando os nematódeos selecionados são do gênero *Meloidogyne*, o nematódeo selecionado pode ser escolhido do grupo consistindo de *M. acrona*, *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* e *M. thamesi*. Em uma modalidade preferida os nematódeos selecionados incluem pelo menos uma das espécies *M. javanica*, *M. incognita*, *M. hapla*, *M. arenaria*, *M. chitwoodi*.

Qualquer espécie de planta pode ser transformada com os polinucleotídeos promotores da invenção. Por exemplo, plantas que podem ser transformadas com os construtos de ácido nucleico contendo os polinucleotídeos promotores da presente invenção incluem, sem limitação, plantas de um gênero selecionado do grupo consistindo de *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*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Heterocallis*, *Nemesis*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*,

Senecio, Salpiglossis, Browaalia, Phaseolus, A vena, e Allium.

Derivados e variantes dos polinucleotídeos promotores podem ser preferivelmente usados em clados de planta, famílias, gênero, ou espécie de planta particulares. Derivados e variantes dos polinucleotídeos promotores que podem ser isolados de uma espécie de planta são preferivelmente usados em plantas do mesmo clado, família, gênero ou espécie de plantas aos quais (à qual) pertence a planta usada para isolamento do derivado e da variante dos polinucleotídeos promotores. De maneira conforme em uma modalidade a planta é uma planta monocotiledônea, preferivelmente uma planta da família Poaceae, Musaceae, Liliaceae ou Bromeliaceae, preferivelmente da família Poaceae. De maneira conforme, em ainda outra modalidade a planta é uma planta Poaceae do gênero Zea, Triticum, Oryza, Hordeum, Secale, Avena, Saccharum, Sorghum, Pennisetum, Setaria, Panicum, Eleusine, Miscanthus, Brachypodium, Festuca ou Lolium. Quando a planta é do gênero Zea, a espécie preferida é *Z. mays*. Quando a planta é do gênero Triticum, a espécie preferida é *T. aestivum*, *T. speltae* ou *T. durum*. Quando a planta é do gênero Oryza, a espécie preferida é *O. sativa*. Quando a planta é do gênero Hordeum, a espécie preferida é *H. vulgare*. Quando a planta é do gênero Secale, a espécie preferida é *S. cereale*. Quando a planta é do gênero Avena, a espécie preferida é *A. sativa*. Quando a planta é do gênero Saccharum, a espécie preferida é *S. officinarum*. Quando a planta é do gênero Sorghum, a espécie preferida é *S. vulgare*, *S. bicolor* ou *S. sudanense*. Quando a planta é do gênero Pennisetum, a espécie preferida é *P. glaucum*. Quando a planta é do gênero Setaria, a espécie preferida é *S. italica*. Quando a planta é do gênero Panicum, a espécie preferida é *P. miliaceum* ou *P. virgatum*. Quando a planta é do gênero Eleusine, a espécie preferida é *E. coracana*. Quando a planta é do gênero Miscanthus, a espécie preferida é *M. sinensis*. Quando a planta é do gênero Brachypodium, a espécie preferida é *B. distachyon*. Quando a planta é uma planta do gênero Festuca, a espécie preferida é *F. arundinaria*, *F. rubra*

ou *F. pratensis*. Quando a planta é do gênero *Lolium*, a espécie preferida é *L. perenne* ou *L. multiflorum*. Alternativamente, a planta pode ser *Triticosecale*.

- Alternativamente, em uma modalidade a planta é uma planta dicotiledônea, preferivelmente uma planta da família *Fabaceae*, *Solanaceae*,
 5 *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Asteraceae*, *Malvaceae*, *Linaceae*,
Euphorbiaceae, *Convolvulaceae*, *Rosaceae*, *Cucurbitaceae*, *Theaceae*,
Rubiaceae, *Sterculiaceae* ou *Citrus*. Em uma modalidade a planta é uma
 planta da família *Fabaceae*, *Solanaceae* ou *Brassicaceae*. De maneira
 conforme, em uma modalidade a planta é da família *Fabaceae*,
 10 preferivelmente do gênero *Glycine*, *Pisum*, *Arachis*, *Cicer*, *Vicia*, *Phaseolus*,
Lupinus, *Medicago* ou *Lens*. Espécies preferidas da família *Fabaceae* são *M.*
truncatula, *M. sativa*, *G. max*, *P. sativum*, *A. hypogea*, *C. arietinum*, *V. faba*,
P. vulgaris, *Lupinus albus*, *Lupinus luteus*, *Lupinus angustifolius* ou *Lens*
culinaris. Mais preferidas são as espécies *G. max* e *A. hypogea*, *M. sativa*.
 15 Mais preferida é a espécie *G. max*. Quando a planta é da família *Solanaceae*, o
 gênero preferido é *Solanum*, *Lycopersicon*, *Nicotiana* ou *Capsicum*. Espécies
 preferidas da família *Solanaceae* são *S. tuberosum*, *L. esculentum*, *N.*
tabaccum ou *C. chinense*. Mais preferida é *S. tuberosum*. De maneira
 conforme, em uma modalidade a planta é da família *Brassicaceae*,
 20 preferivelmente do gênero *Arabidopsis*, *Brassica* ou *Raphanus*. Espécies
 preferidas da família *Brassicaceae* são as espécies *A. thaliana*, *B. napus*, *B.*
oleracea, *B. juncea* ou *B. rapa*. Mais preferida é a espécie *B. napus*. Quando a
 planta é da família *Chenopodiaceae*, o gênero preferido é *Beta* e a espécie
 preferida é a *B. vulgaris*. Quando a planta é da família *Asteraceae*, o gênero
 25 preferido é *Helianthus* e a espécie preferida é *H. annuus*. Quando a planta é da
 família *Malvaceae*, o gênero preferido é *Gossypium* ou *Abelmoschus*.
 Quando o gênero é *Gossypium*, a espécie preferida é *G. hirsutum* ou *G.*
barbadense e a espécie mais preferida é *G. hirsutum*. A espécie preferida do
 gênero *Abelmoschus* é a espécie *A. esculentus*. Quando a planta é da família

Linacea, o gênero preferido é *Linum* e a espécie preferida é *L. usitatissimum*. Quando a planta é da família Euphorbiaceae, o gênero preferido é *Manihot*, *Jatropha* ou *Rhizinus* e a espécie preferida é *M. esculenta*, *J. curcas*, ou *R. comunis*. Quando a planta é da família Convolvulaceae, o gênero preferido é *Ipomea* e a espécie preferida é *I. batatas*. Quando a planta é da família Rosaceae, o gênero preferido é *Rosa*, *Malus*, *Pyrus*, *Prunus*, *Rubus*, *Ribes*, *Vaccinium* ou *Fragaria* e a espécie preferida é o híbrido *Fragaria x ananassa*. Quando a planta é da família Cucurbitaceae, o gênero preferido é *Cucumis*, *Citrullus* ou *Cucurbita* e a espécie preferida é *Cucumis sativus*, *Citrullus lanatus*, ou *Cucurbita pepo*. Quando a planta é da família Theaceae, o gênero preferido é *Camellia* e a espécie preferida é *C. sinensis*. Quando a planta é da família Rubiaceae, o gênero preferido é *Coffea* e a espécie preferida é *C. arabica* ou *C. canephora*. Quando a planta é da família Sterculiaceae, o gênero preferido é *Theobroma* e a espécie preferida é *T. cacao*. Quando a planta é do gênero *Citrus*, a espécie preferida é *C. sinensis*, *C. limon*, *C. reticulata*, *C. maxima*, e híbridos de espécie *Citrus*, ou semelhantes.

Em outra modalidade, o polinucleotídeo promotor é induzido em raízes de uma planta exposta a um estímulo de nematódeo. Um estímulo de nematódeo pode estar presente quando a planta é infectada ou está em processo de se tornar infectada por nematódeos parasitas de planta. Um polinucleotídeo promotor mediador de expressão em resposta a um estímulo de nematódeo é também chamado de polinucleotídeo promotor induzível por nematódeo. O termo expressão preferida em raiz com relação aos promotores, polinucleotídeos promotores, ácidos nucleicos ou polinucleotídeos isolados da invenção significa expressão principalmente em tecido de raiz, em particular em tecido vascular de raiz. Expressão principalmente em tecido de raiz significa, que a quantidade de mRNA produzida sob o controle do polinucleotídeo promotor da invenção é pelo menos 10 vezes, 50 vezes, 100 vezes ou 200 vezes mais alta em uma quantidade particular de tecido de raiz

quando comparada com a quantidade de mRNA produzida na mesma quantidade de outro tecido, e.g. tecido de folha, caule ou flor.

A invenção também é representada como modalidade em cassetes de expressão compreendendo os polinucleotídeos promotores da invenção. "Cassete de expressão" neste contexto é para ser entendido amplamente como compreendendo todas as sequências contidas no cassete que podem influenciar a transcrição de um ácido nucleico de interesse e, se aplicável, sua tradução. Em adição aos polinucleotídeos promotores da invenção, o cassete de expressão da invenção pode adicionalmente compreender elementos regulatórios que aperfeiçoam a função dos polinucleotídeos promotores ou elementos genéticos que permitem tradução e/ou transcrição em organismos procarióticos e/ou eucarióticos, e elementos regulatórios a jusante (em direção-3') tal como uma sequência de terminação de transcrição e uma sequência de poliadenilação. Os vários componentes do cassete de expressão da invenção são sequencialmente e operacionalmente ligados juntos.

De maneira conforme, um cassete de expressão da invenção pode compreender um promotor compreendendo um polinucleotídeo promotor, capaz de mediar expressão induzível por nematódeo e/ou preferida em raiz, sendo que o polinucleotídeo promotor é selecionado do grupo de polinucleotídeos consistindo de a) um polinucleotídeo tendo a sequência mostrada em SEQ ID NO:1; b) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 476 a 1476 de um polinucleotídeo tendo a sequência mostrada em SEQ ID NO:1; c) um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de sequência com o polinucleotídeo de a) ou b); d) um polinucleotídeo hibridizando sob condições estridentes com o polinucleotídeo de a) ou b); e e) um polinucleotídeo compreendendo um fragmento de pelo menos 50 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 100 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 200 nucleotídeos consecutivos de

um polinucleotídeo tendo a sequência mostrada em SEQ ID NO:1. Em outra modalidade, o promotor é induzido em raízes de uma planta infectada por nematódeos parasitas de planta.

Elementos genéticos específicos que podem opcionalmente ser

5 incluídos no cassete de expressão da invenção incluem, sem limitação, origens de replicação para permitir replicação em bactérias, e.g., a região ORI de pBR322 ou a P15A ori; ou elementos exigidos para transferência de T-DNA de *Agrobacterium*, tais como, por exemplo, as bordas esquerda e/ou direita do T-DNA. Outros componentes do cassete de expressão da invenção

10 podem incluir, sem limitação, elementos regulatórios adicionais tais como, por exemplo, intensificadores, íntrons, poliligantes, múltiplos sítios de clonagem, operadores, sítios ligantes de repressor, sítios ligantes de fator de transcrição, e semelhantes. Intensificadores exemplares incluem elementos do promotor CaMV 35S, genes de octopina sintase (Ellis et al., 1987), o gene de

15 actina I de arroz, o gene de álcool desidrogenase de milho (Callis 1987), o gene shrunken I de milho (Vasil 1989), o elemento TMV Omega (Gallie 1989) e promotores de eucariotos de não-planta (e.g. levedura; Ma 1988). Sequências de íntron de planta exemplares incluem íntrons de *Adh1*, *bronzel*, *actin1*, *actin2* (WO 00/760067), ou o íntron de sacarose sintase; veja: "The

20 Maize Handbook", Capítulo 116, Freeling e Walbot, Eds., Springer, Nova Iorque (1994).

Sequências líderes virais também podem intensificar a transcrição de ácidos nucleicos de interesse pelo cassete de expressão da invenção. Por exemplo, tem sido mostrado que sequências líderes de Vírus do

25 Mosaico do Tabaco (TMV), Vírus da Mancha Clorótica do Milho (MCMV), e Vírus do Mosaico da Alfafa (AMV) são eficazes na intensificação da expressão. Outras sequências líderes conhecidas na arte incluem mas não são limitadas a: líderes de Picornavírus, por exemplo, (líder do vírus de encefalomiocardite (EMCV); líderes de Potivírus, líder do Vírus da

Matização/Clorose/Necrose do Tabaco (TEV); líder de MDMV (Vírus do Mosaico Anão do Milho); líder de proteína ligante (BiP) de cadeia pesada de imunoglobulina de humano, líder não-traduzida do mRNA de proteína de capa de vírus do mosaico da alfafa (AMV RNA 4).

5 O cassete de expressão da invenção também compreende um elemento de terminação de transcrição ou sinal de poliadenilação. Elementos de terminação de transcrição exemplares incluem aqueles do gene de nopalina sintase de *A. tumefaciens* (Bevan 1983), o terminador para o transcrito T7 do gene de octopina sintase de *A. tumefaciens*, e a extremidade 3' dos genes de
10 Inibidor I ou II de protease de batateira ou tomateiro.

A segundo polinucleotídeo a ser transcrito em RNA, e, opcionalmente, expressado como uma proteína é inserido no cassete de expressão da invenção para transformação em um organismo. De acordo com a invenção, a sequência de segundo polinucleotídeo é posicionada a jusante
15 (i.e., em direção-3') do polinucleotídeo promotor da invenção e a montante dos elementos de terminação de transcrição, em ligação covalente com os mesmos. Preferivelmente, a distância entre a sequência de segundo polinucleotídeo e o polinucleotídeo promotor da invenção não é maior do que 200 pares de base, mais preferivelmente não maior do que 100 pares de base,
20 muito mais preferivelmente não maior do que 50 pares de base.

Um cassete de expressão da invenção também pode ser montado por inserção de um polinucleotídeo promotor da invenção no genoma da planta. Tal inserção resultará em uma ligação operável em uma sequência de ácido nucleico de interesse nativa no genoma. Tais inserções
25 permitem que o ácido nucleico de interesse seja expressado ou sobre-expressado preferencialmente em tecido de raiz, após indução por nematódeos, como o resultado da transcrição regulando propriedades do polinucleotídeo promotor da invenção. A inserção pode ser dirigida ao acaso. Preferivelmente, a inserção é dirigida e realizada, por exemplo, por

recombinação homóloga. Por este procedimento um promotor natural pode ser substituído no total ou em parte pelo polinucleotídeo promotor da invenção, modificando deste modo o perfil de expressão de um gene endógeno.

5 O cassete de expressão da invenção pode ser inserido em um vetor recombinante, plasmídeo, cosmídeo, YAC (cromossomo artificial de levedura), BAC (cromossomo artificial bacteriano), ou qualquer outro vetor adequado para transformação em uma célula hospedeira. Células hospedeiras preferidas são células bacterianas, em particular células bacterianas usadas
10 para clonagem ou armazenagem de polinucleotídeos ou usadas para transformação de células de planta, tais como, mas não limitadas a, células de *Escherichia coli*, *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, e células de planta. Quando a célula hospedeira é uma célula de planta, o vetor ou cassete de expressão pode se tornar inserido no genoma da célula de planta transformada.
15 Alternativamente, o vetor ou cassete de expressão pode ser mantido extra-cromossomicamente. O vetor ou cassete de expressão da invenção pode estar presente no núcleo, cloroplasto, mitocôndria, e/ou plastídeo das células da planta. Preferivelmente, o vetor ou cassete de expressão da invenção é inserido no DNA cromossômico do núcleo da célula de planta.

20 O cassete de expressão da invenção pode ser transformado em uma planta para fornecer uma planta transgênica compreendendo um ou mais polinucleotídeos em associação operativa com um polinucleotídeo promotor da invenção. A planta transgênica desta modalidade compreende um promotor compreendendo uma sequência de polinucleotídeo promotor como mostrada
25 em SEQ ID NO:1 ou um fragmento mínimo de polinucleotídeo promotor de SEQ ID NO:1. Alternativamente, a planta transgênica da invenção compreende um polinucleotídeo promotor capaz de mediar expressão induzível por nematódeo e/ou preferida em raiz que hibridiza sob condições estridentes com um polinucleotídeo promotor tendo uma sequência como

mostrada em SEQ ID NO:1, ou um fragmento mínimo de polinucleotídeo promotor de SEQ ID NO:1. Ademais, a planta transgênica da invenção compreende um polinucleotídeo promotor capaz de mediar expressão induzível por nematódeo e/ou preferida em raiz tendo pelo menos 70% de identidade de sequência com um polinucleotídeo promotor tendo a sequência mostrada em SEQ ID NO:1, ou um fragmento mínimo de polinucleotídeo promotor de SEQ ID NO:1.

O termo "planta" como aqui usado pode, dependendo do contexto, ser entendido para se referir a plantas inteiras, células de planta, órgãos de planta, sementes colhidas, e progênie dos mesmos. A palavra "planta" também se refere a qualquer planta, particularmente, às plantas de semente, e pode incluir, mas não é limitada a, plantas de cultivo. Partes de planta ou órgãos de planta incluem, mas não são limitadas a, caules, raízes, brotos, frutas, óvulos, estames, folhas, embriões, regiões meristemáticas, tecido de calo, gametófitos, esporófitos, pólen, microesporos, hipotócilos, cotilédones, anteras, sépalas, pétalas, pólen, sementes não colhidas e semelhantes. Sementes colhidas referem-se às sementes, que são removidas da planta produtora das sementes, enquanto que sementes não-colhidas referem-se às sementes ainda conectadas na planta produtora de sementes e.g. estando no estado de crescimento ou amadurecimento. A planta pode ser uma monocotiledônea ou uma dicotiledônea. A planta pode ser uma do gênero selecionado do grupo consistindo de milho, trigo, cevada, sorgo, centeio, triticale, arroz, cana-de-açúcar, árvores cítricas, ananás, coqueiro, bananeira, cafeeiro, chá, tabaco, girassol, ervilha, alfafa, feijão-soja, cenoura, aipo, tomateiro, batateira, algodoeiro, tabaco, berinjela, pimenteira, colza, canola, beterraba, repolho, couve-flor, brócolis, alface, Lotus sp., Medicago truncatula, gramínea perene, raigrás, Arabidopsis thaliana e semelhantes.

As plantas transgênicas da invenção são preparadas por métodos de transformação conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte

de biotecnologia de planta. Qualquer método pode ser usado para transformar o vetor de expressão recombinante em células de planta para dar as plantas transgênicas da invenção. Métodos adequados de transformação ou transfecção de células hospedeiras incluindo células de planta podem ser encontrados, por exemplo, em WO2006/024509 (PCT/EP2005/009366; USSN60/6060789) e em Sambrook et al. supra, e em outros manuais de laboratório tal como "Methods in Molecular Biology", 1995, Vol. 44, "Agrobacterium protocols", Ed: Gartland e Davey, Humana Press, Totowa, Nova Jérsei. Métodos gerais para transformar plantas dicotiledôneas também são revelados, por exemplo, em Patentes U.S. Nos. 4.940.838; 5.464.763, e semelhantes. Métodos para transformar plantas dicotiledôneas específicas, por exemplo, algodoeiro, são mostrados em Patentes U.S. Nos. 5.004.863; 5.159.135; e 5.846.797. Métodos de transformação de feijão-soja são mostrados em Patentes U.S. Nos. 4.992.375; 5.416.011; 5.569.834; 5.824.877; 6.384.301 e em EP 0301749B1. Outros métodos de transformação de planta são revelados, por exemplo, em Patentes U.S. Nos. 4.945.050; 5.188.958; 5.596.131; 5.981.840, e semelhantes.

Métodos de transformação podem incluir métodos diretos e indiretos de transformação. Métodos diretos adequados incluem absorção de DNA induzida por poli(etileno-glicol), transformação mediada por lipossomo (US 4.536.475), métodos biolísticos usando pistola de gene (Fromm ME et al., Bio/Technology. 8(9):833-9, 1990; Gordon-Kamm et al. Plant Cell 2:603, 1990), eletroporação, incubação de embriões secos em solução compreendendo DNA, e microinjeção. No caso destes métodos diretos de transformação, os plasmídeos usados não necessitam atender às exigências particulares. Plasmídeos simples, tais como aqueles da série pUC, pBR322, da série M13mp, pACYC184 e semelhantes podem ser usados. Se plantas intactas são para serem regeneradas a partir das células transformadas, um gene marcador selecionável é preferivelmente localizado no plasmídeo. As

técnicas de transformação diretas são igualmente adequadas para plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas. Transformação também pode ser realizada por infecção bacteriana por meio de *Agrobacterium* (por exemplo EP 0.116.718), infecção viral por intermédio de vetores virais (EP 0.067.553; 5 US 4.407.956; WO 95/34668; WO 93/03161) ou por meio de pólen (EP 0.270.356; WO 85/01856; US 4.684.611). Técnicas de transformação baseadas em *Agrobacterium* (especialmente para plantas dicotiledôneas) são bem conhecidas na arte. A cepa de *Agrobacterium* (e.g., *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*) compreende um plasmídeo 10 (plasmídeo Ti ou Ri) e um elemento T-DNA que é transferido para a planta após infecção com *Agrobacterium*. O T-DNA (DNA transferido) é integrado no genoma da célula de planta. O T-DNA pode estar localizado no plasmídeo-Ri ou -Ti ou está separadamente compreendido em um denominado vetor binário. Métodos para a transformação mediada por *Agrobacterium* são 15 descritos, por exemplo, em Horsch RB et al. (1985) *Science* 225:1229. A transformação mediada por *Agrobacterium* está melhor adaptada para plantas dicotiledôneas mas também tem sido adaptada para plantas monocotiledôneas. A transformação de plantas por *Agrobacteria* é descrita em, por exemplo, White FF, "Vectors for Gene Transfer in Higher Plants, Transgenic Plants", Vol. 1, "Engineering and Utilization", edited by S.D. 20 Kung e R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15 - 38; Jenes B et al. "Techniques for Gene Transfer, Transgenic Plants", Vol. 1, "Engineering and Utilization", edited by S.D. Kung e R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 128-143; Potrykus (1991) *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* 42:205- 225. Transformação 25 pode resultar em expressão e transformação estáveis ou transientes. Embora uma sequência de nucleotídeos da presente invenção possa ser inserida em qualquer planta ou célula de planta caindo dentro destas classes amplas, ela é particularmente útil em células de planta de cultivo.

As plantas transgênicas da invenção podem ser cruzadas com

plantas transgênicas similares ou com plantas transgênicas faltantes de genes operacionalmente associados com o polinucleotídeo promotor da invenção ou com plantas não-transgênicas, usando métodos conhecidos de geração de planta, para preparar semente. Ademais, a planta transgênica da presente invenção pode compreender, e/ou ser cruzada com outra planta transgênica que compreende, um ou mais genes diferentes operacionalmente ligados em um polinucleotídeo promotor da presente invenção ou em outro promotor, criando assim uma "pilha" de transgenes na planta e/ou em sua progênie. A semente é então plantada para obter uma planta transgênica fértil compreendendo o ácido nucleico de interesse e o polinucleotídeo promotor da invenção. A planta transgênica fértil cruzada pode ter o cassete de expressão particular herdado através de uma planta parental fêmea ou através de uma planta parental macho. A segunda planta pode ser uma planta endogâmica. A planta transgênica fértil cruzada pode ser um híbrido. Também estão incluídas dentro do escopo da presente invenção as sementes de qualquer uma destas plantas transgênicas férteis cruzadas. As sementes desta invenção podem ser colhidas de plantas transgênicas férteis e usadas para crescer gerações de progênie de plantas transformadas desta invenção incluindo linhagens de planta híbrida compreendendo o construto de DNA.

"Empilhamento de gene" também pode ser realizado por transferência de dois ou mais polinucleotídeos para dentro do núcleo de célula por transformação de planta. Neste contexto, "gene" refere-se a ambos polinucleotídeos que codificam uma proteína de comprimento total e polinucleotídeos que codificam um construto de RNAi ou um domínio de uma proteína de comprimento total. Múltiplos polinucleotídeos podem ser introduzidos no núcleo da célula durante transformação quer sequencialmente quer simultaneamente. Múltiplos genes de planta ou genes de patógeno alvo podem ser infra-regulados por mecanismos de silenciamento de gene, especialmente RNAi, pelo uso de um transgene único selecionador de

múltiplas sequências parciais ligadas de interesse. Genes múltiplos, empilhados sob o controle de promotores individuais também podem ser sobre-expressados para alcançar um fenótipo único ou múltiplo desejado. Construtos contendo pilhas de gene de ambos os genes sobre-expressados e alvos silenciados também podem ser introduzidos em plantas dando fenótipos únicos ou múltiplos agronomicamente importantes. Em certas modalidades as sequências de ácido nucleico da presente invenção podem ser empilhadas com qualquer combinação de sequências de polinucleotídeo de interesse para criar fenótipos desejados. As combinações podem produzir plantas com uma variedade de combinações de traços incluindo mas não limitadas a resistência à doença, tolerância a herbicida, intensificação de rendimento, tolerância ao frio e à estiagem. Estas combinações empilhadas podem ser criadas por qualquer método incluindo mas não limitado a geração cruzada de plantas por métodos convencionais ou por transformação genética. Se os traços são empilhados por transformação genética, as sequências de polinucleotídeo de interesse podem ser sequencial ou simultaneamente combinadas em qualquer ordem. Por exemplo se dois genes são para serem introduzidos, as duas sequências podem estar contidas em cassetes de transformação separados ou no mesmo cassete de transformação. A expressão das sequências pode ser conduzida por promotores iguais ou diferentes.

A invenção adicionalmente compreende uma plantação compreendendo uma pluralidade de plantas transgênicas da invenção, plantadas juntas em um campo agrícola.

As plantas transgênicas da invenção podem ser usadas em um método de controle de uma infestação de nematódeo parasita de planta em uma plantação, que compreende a etapa de crescer dita plantação a partir de sementes compreendendo um cassete de expressão compreendendo um polinucleotídeo promotor de planta da invenção em associação operativa com um segundo ácido nucleico que codifica um agente que interrompe o

metabolismo, o crescimento e/ou a reprodução de dito nematódeo parasita de planta, que aperfeiçoa a tolerância da planta ao dito nematódeo parasita de planta, ou que é tóxico ao dito nematódeo parasita de planta, sendo que o cassete de expressão está estavelmente integrado nos genomas de células de planta, de plantas e/ou de sementes. Tais agentes incluem, sem limitação, um RNA de fita dupla que é substancialmente idêntico a um gene alvo de um nematódeo parasita de planta que é essencial para sobrevivência, metamorfose, ou reprodução do nematódeo; um RNA de fita dupla que é substancialmente idêntico a um gene de planta exigido para manter um sítio de alimentação de nematódeo; um RNA de anti-senso, um siRNA, um miRNA ou seu precursor, uma proteína que interfere com o metabolismo, a sobrevivência, a metamorfose, ou a reprodução do nematódeo, ou uma toxina microbiana, uma toxina derivada de um inseto, ou qualquer toxina que interfere com o metabolismo, a sobrevivência ou a reprodução do nematódeo, e semelhantes.

Os seguintes exemplos não são intencionados para limitarem o escopo das reivindicações da invenção, mas mais propriamente são intencionados para serem exemplares de certas modalidades. Quaisquer variações nos métodos exemplificados que ocorrem para o técnico experiente são intencionadas para caírem dentro do escopo da presente invenção.

EXEMPLO 1: Clonagem de um promotor de Arabidopsis induzível por SCN

DNA genômico de Arabidopsis (ecotipo Columbia) foi extraído. A região do DNA genômico de 1.476 pb (SEQ ID NO :1) (sequência de promotor putativa) diretamente a montante do códon ATG incluindo a região 5'-não-traduzida correspondendo ao identificador de locus At5g12170 de Arabidopsis foi clonado usando protocolos de amplificação por PCR padrão. O fragmento de DNA de 1.476 pb correspondendo às regiões de promotor de At5g12170 é mostrado como SEQ ID NO:1. Resultados de análise em PLACE (National Institute of Agrobiological Sciences, Ibaraki,

Japão) indicam que um box TATA não está presente em SEQ ID NO:1 na região 300bp a montante da extremidade 3' da sequência de promotor.

EXEMPLO 2: Clonagem de gene semelhante a At5g12170 de feijão-soja

Glycine max cv. Williams 82 foi germinado sobre placas de ágar por três dias e então transferido para bolsas de germinação. Um dia mais tarde, cada planta jovem foi inoculada com nematódeos juvenis de segundo estágio (J2) de *H. glycines* race 3. Seis dias após inoculação, tecido de raiz novo foi fatiado em pedaços de 1 cm de comprimento, fixado, embebido em um criomolde, e seccionado usando métodos conhecidos. Células sinciciais foram identificadas por sua morfologia singular de tamanho de célula aumentado, parede celular espessada, e citoplasma denso e dissecadas em tampão de extração de RNA usando um microscópio PALM (P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH, Bernried, Alemanha).

RNA celular total foi extraído, amplificado, e fluorescentemente marcado usando métodos conhecidos. Como controles, RNA total foi isolado de ambos "não-sincícios" e raízes de controle não tratadas submetidas ao mesmo processo de amplificação de RNA. O RNA amplificado foi hibridizado com arranjos de cDNA de feijão-soja patenteados. A tabela em Figura 4 resume os dados de expressão medidos por análise de microarranjo de cDNA para este gene através de três amostras de tecido/célula: tecidos de raiz de controle não tratados, não-sincícios infectados com SCN, e sincícios. Níveis relativos de expressão de gene são mostrados como intensidades de sinal normalizadas ($\pm$ desvio padrão). Como demonstrado em Figura 4, clone GM50657480 de cDNA de feijão-soja foi identificado como estando supra-regulado em sincícios de raízes de feijão-soja infectadas com SCN. Figura 3 mostra a sequência de aminoácidos de clone GM50657480 de cDNA de feijão-soja (SEQ ID NO:3). A sequência de cDNA GM50657480 (SEQ ID NO:2) foi determinada em não ser de comprimento total porque não houve o códon de iniciação ATG e foi baseado

no alinhamento da sequência de aminoácidos de GM50657480 (SEQ ID NO: 3) com a sequência de aminoácidos de At5g12170 (SEQ ID NO:4) mostrado em Figura 6.

EXEMPLO 3 Ensaio de raiz peluda transgênica de atividade de promotor de comprimento total

Para avaliar a atividade de expressão do promotor clonado, nucleotídeos 1-1476 de SEQ ID NO:1 foram clonados a montante de um gene repórter GUS (gene de β -glicuronidase bacteriana ou GUS (Jefferson (1987) EMBO J. 6, 3901-3907) para criar o vetor binário "pAW280". O marcador selecionável de planta no vetor binário é uma forma resistente a herbicida do gene de aceto-hidróxi-ácido-sintase (AHAS) de *A. thaliana* dirigido pelo promotor AHAS nativo de *A. thaliana* (Sathasivan et al., Plant Phys. 97:1044-50, 1991).

Vetor binário pAW280 foi transformado em cepa K599 de *A. rhizogenes* por eletroporação (Cho et al., (1998) Plant Sci. 138, 53-65). Antes da inoculação de *A. rhizogenes*, sementes de *G. max* Williams 82 (suscetível a SCN) foram germinadas, cotilédones foram excisados, e o lado adaxial foi ferido várias vezes. Uma suspensão de *A. rhizogenes* foi inoculada sobre a superfície ferida, e o cotilédone inoculado foi incubado com o lado adaxial para cima por três dias a 25°C sob 16 horas de luz do dia. Os cotilédones foram então transferidos para cima de placas MS contendo carbenicilina (para suprimir crescimento de *A. rhizogenes*) e ARSENAL 1 uM (imazapir, BASF Corporation, Florham Park, NJ) como o agente de seleção. Raízes peludas foram induzidas do sítio de ferimento após duas semanas. As raízes resistentes a ARSENAL e crescendo sobre o meio de seleção foram colhidas e transferidas para cima de meio de seleção fresco da mesma composição e incubadas a 25°C no escuro. As duas semanas após a colheita das raízes peludas e o cultivo delas sobre meio de seleção, as raízes peludas foram subcultivadas sobre meio MS

contendo carbenicilina mas não ARSENAL.

Várias linhagens de raiz peluda transgênica independentes foram geradas da transformação com pAW280. Aproximadamente três semanas após subcultura, as linhagens de raiz peluda transgênica foram inoculadas com *H. glycines* race 3 J2. Doze dias após inoculação de *H. glycines* (DAI), as raízes peludas foram colhidas e ensaiadas para atividade de β -glicuronidase do gene GUS usando ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-glicurônico (x-Gluc). Em cada instante de tempo após a inoculação, uma placa de controle não-inoculada de cada linhagem também foi corada em solução de coloração GUS. As raízes foram então observadas sob um microscópio para detecção de expressão de GUS. Para cada linhagem transgênica, 10 sincícios recolhidos aleatoriamente foram observados e classificados para intensidade de expressão de GUS. O seguinte índice de escore foi usado: "-" para não coloração, "+" para coloração fraca, "++" para coloração forte. Uma média arredondada de 10 contagens foi usada para determinar o nível de expressão de GUS nos sincícios para aquela linhagem. Em adição, nível de expressão de GUS nas mesmas linhagens para outros tecidos de raiz tais como calo, ponta de raiz, vasculatura, cortical e primordial também foram registrados usando o mesmo índice de escore de GUS "-" para sem coloração, "-/+" indica que houve aproximadamente 25% das linhagens testadas mostrando coloração GUS vascular em menos de 25% do tecido de raiz observado, "+" para coloração fraca, "++" para coloração forte. Os resultados para linhagens transformadas com pAW280 são apresentados em Figura 7. O resultado da coloração GUS indica que para a maioria das linhagens testadas, o fragmento de promotor em pAW280 mostrou expressão de GUS forte nos sincícios a 12 DAI. Em contraste, expressão de GUS nas outras partes de raiz tais como pontas de raiz, tecido vascular, e córtex de raiz foi não detectada, elevadamente variável entre linhagens, ou fraca.

EXEMPLO 4: Ensaio de raiz peluda transgênica de fragmentos de promotor mínimos

Um fragmento de deleção de promotor de 1001 pb representado pelas bases 476 a 1476 de SEQ ID NO:L e um fragmento de deleção de promotor de 500 pb representado pelas bases 977 a 1476 de SEQ ID NO:1 foram amplificados de pAW280 usando iniciadores baseados em SEQ ID NO:1 e um protocolo de amplificação por PCR padrão. O tamanho de fragmento de DNA amplificado para cada produto de PCR foi verificado por eletroforese em gel de agarose padrão e o DNA extraído do gel por Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). As deleções de promotor derivadas de SEQ ID NO:1 foram clonadas a montante do gene repórter GUS para criar os vetores binários "RTJ119" e "RTJ120", respectivamente. O marcador de seleção de planta nos vetores binários foi o gene AHAS mutado dirigido pelo promotor AHAS de Arabidopsis descrito em Exemplo 3. Vetores binários pAW280, RTJ119 e RTJ120 foram transformados em cepa K599 de *A. rhizogenes* para gerar raízes peludas transgênicas como descrito em Exemplo 3. As linhagens de raiz peluda transgênica foram inoculadas com *H. glycines* SCN race 3 J2 e expressão de GUS foi ensaiada como descrito em Exemplo 3.

Os resultados para linhagens transformadas com pAW280, RTJ119, e RTJ120 são apresentados em Figura 8. O fragmento de promotor mínimo de 1001 pb de SEQ ID NO:1 contido em RTJ119 conferiu expressão induzida por nematódeo em sincícios. A intensidade de coloração de sincícios em RTJ119 não foi tão forte quanto observada em pAW280. O fragmento de 500 pb de SEQ ID NO:1 contido em RTJ120 não conferiu expressão induzida por nematódeo em sincícios.

EXEMPLO 5 Coloração de GUS de planta inteira

Plantas inteiras de feijão-soja transgênicas são geradas contendo as sequências de promotor representadas por SEQ ID NO:1 ou suas

variantes em associação operativa com o gene repórter GUS por transformação de construtos representativos para caracterizar expressão de promotor em resposta à infecção de nematódeo em raízes e tecidos de planta inteira durante todo o ciclo de vida da planta. Métodos representativos de

5 caracterização de promotor em plantas inteiras de feijão-soja incluem mas não são limitadas às seguintes descrições. Sementes T1 de feijão-soja transgênicas são testadas para zigoticidade e eventos de cópia única são germinados, crescidos em condições de estufa, e amostrados para expressão de GUS em

10 vários estágios de desenvolvimento em tecidos de folha, caule, flor, embrião, e vagem de semente. Em adição, tecidos de raiz são colhidos em vários tempos antes a após infecção por SCN em raízes inoculadas e de controle não-inoculadas. Plantas múltiplas são testadas para cada evento para determinar tendências consistentes na análise de coloração de GUS. Amostras

15 colhidas são excisadas da planta e ensaiadas para expressão de GUS como descrito em Exemplo 3. Os tecidos são então observados e seus escores são determinados para a intensidade de coloração de GUS.

REIVINDICAÇÕES

1. Promotor, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo promotor isolado capaz de mediar expressão induzível por nematódeo e/ou preferida em raiz selecionado do grupo de polinucleotídeos consistindo de:

a) um polinucleotídeo tendo a sequência compreendendo nucleotídeos 1 a 1476 de SEQ ID NO:1;

b) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 476 a 1476 de um polinucleotídeo tendo a sequência mostrada em SEQ ID NO:1;

c) um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de sequência com o polinucleotídeo de a) ou b);

d) um polinucleotídeo hibridizando sob condições estridentes com o polinucleotídeo de a) ou b); e

e) um polinucleotídeo compreendendo um fragmento de pelo menos 50 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 100 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 200 nucleotídeos consecutivos de SEQ IDNO:1.

2. Promotor de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado tem a sequência compreendendo nucleotídeos 1 a 1476 de SEQ ID NO:1.

3. Promotor de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado compreende nucleotídeos 476 a 1476 de SEQ ID NO:1.

4. Promotor de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado tem pelo menos 70% de identidade de sequência com:

a) o polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1 a 1476 de SEQ ID NO:1; ou

b) o polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 476 a 1476 de SEQ ID NO:1.

5. Promotor de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado hibridiza com:

a) o polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1 a 1476 de SEQ ID NO:1; ou

5 b) o polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 476 a 1476 de SEQ ID NO:1.

6. Cassete de expressão, caracterizado pelo fato de compreender o promotor como definido na reivindicação 1.

10 7. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o segundo polinucleotídeo confere a uma planta um traço selecionado do grupo consistindo de rendimento aumentado, sobrevivência aumentada sob condições de estresse, qualidade nutricional aumentada, resistência aumentada a um nematódeo parasita de planta, teor de proteína modificado, e teor de óleo modificado.

15 8. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o segundo polinucleotídeo confere resistência aumentada a um nematódeo parasita de planta por codificação de:

a) um agente que interrompe metabolismo, crescimento, ou reprodução do nematódeo parasita de planta; ou

20 b) um agente que é tóxico para o nematódeo parasita de planta.

9. Planta transgênica, caracterizada pelo fato de estar transformada com um cassete de expressão compreendendo um polinucleotídeo promotor isolado em associação operativa com a segundo polinucleotídeo, sendo que;

25 a) polinucleotídeo promotor isolado é selecionado do grupo de consistindo de:

i) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1 a 1476 de SEQ ID NO:1;

ii) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 476 a

1476 de SEQ ID NO:1;

iii) um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de sequência com o polinucleotídeo de i) ou ii);

iv) um polinucleotídeo hibridizando sob condições estridentes com o polinucleotídeo de i) ou ii); e

v) um polinucleotídeo compreendendo um fragmento de pelo menos 50 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 100 nucleotídeos consecutivos, ou pelo menos 200 nucleotídeos consecutivos de SEQ IDNO:1; ou

b) o polipeptídeo promotor isolado é capaz de mediar expressão induzível por nematódeo ou preferida em raiz.

10. Planta de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a planta é uma monocotiledônea.

11. Planta de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a planta é uma dicotiledônea.

12. Planta de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a planta é selecionada do grupo consistindo de milho, trigo, cevada, sorgo, centeio, tritcale, arroz, cana-de-açúcar, árvores cítricas, ananás, coqueiro, bananeira, cafeeiro, chá, tabaco, girassol, ervilha, alfafa, feijão-soja, cenoura, aipo, tomateiro, batateira, algodoeiro, tabaco, berinjela, pimenteira, colza, canola, beterraba, repolho, couve-flor, brócolis, alface, Lotus sp., Medicago truncatula, gramínea perene, raigrás, e Arabidopsis thaliana.

13. Planta de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado compreende nucleotídeos 1 a 1476 de SEQ ID NO:1.

14. Planta de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado compreende nucleotídeos 476 a 1476 de SEQ ID NO:1.

15. Planta de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado tem pelo menos 70% de

identidade de sequência com:

a) o polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1 a 1476 de SEQ ID NO:1, ou

b) o polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 476 a 1476 de SEQ ID NO:1.

16. Planta de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado hibridiza com:

a) o polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1 a 1476 de SEQ ID NO:1, ou

b) o polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 476 a 1476 de SEQ ID NO:1.

17. Método para conferir ou aperfeiçoar resistência a nematódeo em uma planta, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

a) preparar o cassete de expressão como definido na reivindicação 6;

b) transformar uma célula de planta com o cassete de expressão da etapa a);

c) regenerar a célula de planta transformada para produzir uma planta transgênica, e

d) selecionar uma planta tendo resistência a nematódeo aperfeiçoada em comparação com uma planta tendo o mesmo genótipo que não compreende o cassete de expressão.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o segundo polinucleotídeo operacionalmente ligado aperfeiçoa a resistência de uma planta a um nematódeo parasita de planta por codificação de:

a) um agente que interrompe o metabolismo, o crescimento, ou a reprodução do nematódeo parasita de planta, ou

b) um agente que é tóxico para o nematódeo parasita de planta.

Figura 1

```

1   GCTCGCGTTA GTTCCACTCA AGGAGTATCC TTTCTTCCTT GCGCAACTCT
51  CCACCTTCGG GTAAAGTACC ATCTCTAGCA TCTTGAGTCT TGATCAACTT
101 CTGTTTTGCT TACTCTCAAA ATGCATTAAT TTTTTTTTAT ACTAGATCAT
151 AGTATTATAT CTCTTAATCT ACCTATTGAA ATCTACTTAA TGTTTTTACT
201 AAAACCTACG TGTTCCTCTT TAGAGAAITT TGTGCTATGC ATGAATTAGA
251 GGTTAGTAAT GTGTAATACT TCATAAGTCT AGATTTATTT GTTGGTTAAC
301 ACGTTTAGTA ATTCACACAC ACACACCACC TTAGATATTT TACTGTGAAT
351 TAGAAAAAGA TACATAGTTA GGAGTGTTTT TTTAAAAAAA TTCAATCATG
401 AGAAAATTAG AGGTGTGATG TTATACATTA TGAAAATGCA AAGGGCAGAT
451 ACGAATAAAT TAGAAACTTG TTTAACGGGT CAGAGTTGGC TTCTAGTCTC
501 TTTCGACTTG GATACTTCTT CTTCTACAAT TGGGACATTA TTGTAGGCGC
551 ATTATATCAT TTCTCTACAT GCAATGAATG TACATACATT AATTCACATT
601 TATTTTTGGA ATAATCATAT GAGTGATCGA AGTTTGTATT TATATATTCA
651 ATCTTCACAA ACTACTTTTA TTTAAAAATC ATTTGCAAAA TGCTATTTTA
701 TTGACAAAAA GATATATGCT ATAAAATAAA ATAAAATTCA CAAACTATAG
751 TCATTAATAC AAAAAGAAAT CATTGAATAT GGTAGAGGGG AAACAAAAAA
801 AAAACACGAC GATGTAAGTT GGTGGAACCA CATTATCAAA ATAAAAGAAG
851 GTGGTGGAAC CAAATTGAAT AAAGTCCGTC CATATCATT A TCCGTCCCTT
901 AGGAGCCTCT AATTAGTAAT ATTCTTATGG GTCCACTGTG GCTTAGAGGA
951 CTTGATTAAA ACCATTCTTA TTTAGTGCTA ACTTTGTGAG GGTGGAATA
1001 ACGAACCAAG CTGATTCAAA CCATTCCAAA ACAAAGTTGT CACATATTTT
1051 AAAACCAAG TTTACCGGAC AGAGAAATAT GGTGTGTTTT TCTCAAACCA
1101 AGCTAAATGG AATCCATTGT AAACCAAAAT GTTCACACCT ACCTATTCTT
1151 TTGGAGTCCC TTTTCCATGT GTTTGCTGTC TGCTAGTCAA GTTTCATTAG
1201 CTGATTGCCT TGCATCATAT TCTTGGATCA ACTTTTTTTT TTTTTTTTTT
1251 TGGGGTAATT AACAAAATGC TTAAATTTCT CAAGACTATA GGATCACATT
1301 ACCTGTGTGC TTAACATAAC TTTTAGATAG GCTAGAGAAT TGATCTATTA
1351 CAAGATAATC AATAATTTAC AGAAGAAAAC ATTCTTTTTT TTGTTCTATT
1401 TCCTTCATGT AGGTATGTAG CTGTATATTA TACTATCTTG TATTTTCGAT
1451 ATCGTGCTGG AACTGTCACA GATGCA (SEQ ID NO:1)

```

Figura 2

```

1   AAGATGGTGC AGCCTGCTTC CTAAATTTTG GTACATTATC AAGTGGATGT
51  GATGGTGCCC CTCTGCTTCC TCTGCTGTTT ATTATTGTAA ACATAGGTTT
101 CAATATTGCA TTGCTTCATC TCCTCAAGAT CTCTTCAGCT GTTGTATCTT
151 GTCTTGCTTC CACATTTTCA GTCCCAATAT CCATCTACGT GTTCACCATG
201 CCATTGCCAT ACCTTGGTGT TGCCTCCTCT CTTCCAACAG GCTTTATGGC
251 AGGGGCCATT ATCCTCATTI TGGGCTTACT CATTTATGCT TGGACCCCTT
301 CAAATGGTTC CTCGGGTGCT TCCTTCTCAA CTTCCTCCAC CTAGAGAGGC
351 TAGAATGAGT TGACATGTCA TTGCAGATAG TACAACACCA CAAGGAACTA
401 ATTCAGGTTC GCTTTTAGGA GACGGCTATA AGAAGGAGAA AGAAATAGGG
451 CGTTCTTGTA AGTTGTAATA GTTGTTTCGTA AGCATTTTTT ATGAGCTAAG
501 CTTAAGTAAG AAAGAGACTA GACTATAGAT AGAACAGGTT CCAAGTTCAA
551 TTTTATGTA AGCTAAGGAA AGTAAATAGA GAATAAAAGT CACTTTGTTG
601 ACAGAGGAAA TGATATTGGA CCATTGATGAT GCAAAAAAAA AAAAAAA
    (SEQ ID NO:2)

```

Figura 3

```
1   DGAACFLNEG TLSSGCDGAP LLPLLFIIVN IGFNIALHL LKISSAVVSC
51  LASTFSVPIS IYVFTMPLPY LGVASSLPTG FMAGAIILIL GLLIYAWTPS
101 NGSSGASFST SST* (SEQ ID NO:3)
```

Figura 4

Nome do gene	Sincícios #1(N) [¶]	Sincícios #2 (N)	Não Sincícios	Raiz não tratada
50657480 [§]	299±47 (4)	369±57 (5)	ND*	ND

Figura 5

```
1  MLSVPKSPFL  IVGILEALAA  AAGMAAAANL  SGPSTTVLSQ  RKPNTRMYS  
51  SSRNCRQCGK  VRSAFVLIFC  GSGAAHSLNE  AGVLWILLMV  LSFLLQGAGT  
101 VLKEVIFIDS  QRRLKGASLD  LFIVNSYGSA  FQAICIALLL  PFLSKLWGIP  
151 FNQLGTYLKD  GAVCFLNNGT  ITKGCDGAPF  LPLLFVIMNI  GYNIALLRLL  
201 KISSAVVSCL  ASTVSVPIAV  FLFTMPLPYL  GVASSLPKGF  MGGTIILVLG  
251 MILYSWTPHG  ANSSHTDSVI  PSPPPT*    (SEQ ID NO:4)
```

Figura 6

		1	50
SEQ ID NO:3	(1)	-----	
SEQ ID NO:4	(1)	MLSVPKSPFLIVGILEALAAAAGMAAAANLSGPSTTVLSQRKPNTRMYSC	
		51	100
SEQ ID NO:3	(1)	-----	
SEQ ID NO:4	(51)	SSRCNRQCGKVRSAFVLIFCGSGAAHSLNEAGVLWILLMVLSFLLQGAGT	
		101	150
SEQ ID NO:3	(1)	-----	
SEQ ID NO:4	(101)	VLKEVIFIDSQRRLKGASLDLFIIVNSYGSFAFQAICIALLLPFLSKLWGIP	
		151	200
SEQ ID NO:3	(1)	-----DGAACFLNFGTLSSGCDGAPLLPLLFIIIVNIGFNIALLLHLL	
SEQ ID NO:4	(151)	FNQLGTYLKDGAFCFLNNGTITKGCDGAPFLPLLFVIMNIGYNIALLRLL	
		201	250
SEQ ID NO:3	(42)	KISSAVVSCLASTFSVPISIVFTMPLPYLGVASSLPTGFMAGAILILIG	
SEQ ID NO:4	(201)	KISSAVVSCLASTVSVPIAVFLFTMPLPYLGVASSLPKGFMGGTIIILVLG	
		251	277
SEQ ID NO:3	(92)	LLIYAWTPSNGSSGASFSTST-----	
SEQ ID NO:4	(251)	MILYSWTPHGANSSHTDSVIPSPPT-	

Figura 7**Infectada com nematódeo:**

SeqID	Construtor	Ponta de raiz	Vascular	Cortical	Sincícios
1	pAW280	-	-/+	-	++

Controle não infectado:

SeqID	Construtor	Ponta de raiz	Vascular	Cortical
1	pAW280	-	-/+	-

Figura 8

Infectada com nematódeo:

SeqID	Construtor	Ponta de raiz	Vascular	Cortical	Sincícios
1	pAW280	-	-/+	-	++
	RTJ119	-	-/+	-	+
	RTJ120	-	-	-	-

Controle não infectado:

SeqID	Construtor	Ponta de raiz	Vascular	Cortical
1	pAW280	-	-/+	-
1	RTJ119	-	-/+	-
	RTJ120	-	-/+	-

Figura 9

Iniciador Comum	SEQ ID NO	Sequência 5' a 3'
At5g12170For	5	CCCGGGGCTCGCGTTAGTTCCACTC
At5g12170Rev	6	GGCGCGCCTGCATCTGTGACAGTTCCAG
pAW280pr1kbFor	7	ACGTCTGCAGCGGGTCAGAGTTGGCTTC
pAW280pr500bpFor	8	AGCTCTGCAGGCTAACTTTGTGAGGGTTG
pAW280prRev	9	TGCAGGCGCGCCTGCATCTGTG

RESUMO

“PROMOTOR, CASSETE DE EXPRESSÃO, PLANTA TRANSGÊNICA, E, MÉTODO PARA CONFERIR OU APERFEIÇOAR RESISTÊNCIA A NEMATÓDEO EM UMA PLANTA”

- 5 A invenção proporciona polinucleotídeos que são específicos para raiz e/ou induzidos por nematódeos parasitas. Os promotores da invenção são úteis para controlar expressão de ácidos nucleicos de interesse em raízes de planta.

LISTAGEM DA SEQUÊNCIA

<110> BASF Plant Science GmbH
 Wiig, Aaron
 <120> "NOVOS PROMOTORES INDUZÍVEIS POR NEMATÓDEO DE GENE DE PLANTA E
 MÉTODOS DE USO"
 <130> 15142
 <160> 9
 <170> PatentIn version 3.4
 <210> 1
 <211> 1476
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 1
 gctcgcgtta gttccactca aggagtatcc tttcttcctt gcgcaactct ccaccttcgg 60
 gtaaagtacc atctctagca tcttgagtct tgatcaactt ctgttttgct tactctcaaa 120
 atgcattaat ttttttttat actagatcat agtattatat ctcttaatct acctattgaa 180
 atctacttaa tgtttttact aaaacctacg tgtttctctt tagagaattt tgtgctatgc 240
 atgaattaga ggtagtaaat gtgtaatact tcataagtct agattttattt gttggttaac 300
 acgttttagta attcacacac acacaccacc ttagatatatt tactgtgaat tagaaaaaga 360
 tacatagtta ggagtgtttt tttaaaaaaa ttcaatcatg agaaaattag aggtgtgatg 420
 ttatacatta tgaaaatgca aagggcagat acgaataaat tagaaacttg tttaacgggt 480
 cagagttggc ttctagtctc tttcgacttg gatacttctt cttctacaat tgggacatta 540
 ttgtaggcgc atttatcat tctctacat gcaatgaatg tacatacatt aattcacatt 600
 tatttttggga ataatcatat gagtgatcga agtttgtatt tatatattca atcttcacaa 660
 actactttta tttaaaaatc atttgcaaaa tgctatttta ttgacaaaaa gatatatgct 720
 ataaaaataa ataaaattca caaactatag tcattaatac aaaaagaaat cattgaatat 780
 ggtagagggg aaacaaaaaa aaaacacgac gatgtaagtt ggtggaacca cattatcaaa 840
 ataaaagaag gtggtggaac caaattgaat aaagtccgtc catatcatta tccgtccctt 900
 aggagcctct aattagtaat attcttatgg gtccactgtg gcttagagga cttgattaaa 960
 accattctta tttagtgtca actttgtgag ggttggaata acgaaccaag ctgattcaaa 1020
 ccattccaaa acaaagtgtg cacataattc aaaaccaaag tttaccggac agagaaatat 1080
 ggtgtgtttt tctcaaacca agctaaatgg aatccattgt aaaccaaatt gttcacacct 1140
 acctattctt ttggagtccc ttttccatgt gtttgtgtgc tgctagtcaa gtttcattag 1200
 ctgattgcct tgcatacat tcttgatca actttttttt tttttttttt tggggtaatt 1260
 aacaaaatgc ttaaatttct caagactata ggatcacatt acctgtgtgc ttaacataac 1320
 ttttagatag gctagagaat tgatctatta caagataatc aataatttac agaagaaaac 1380
 attctttttt ttgttctatt tccctcatgt aggtatgtag ctgtatatta tactatcttg 1440
 tattttcgat atcgtgctgg aactgtcaca gatgca 1476
 <210> 2
 <211> 647
 <212> DNA
 <213> Glycine max
 <400> 2
 aagatgggtgc agcctgcttc ctaaattttg gtacattatc aagtggatgt gatgggtgcc 60
 ctctgcttcc tctgctgttt attattgtaa acatagggtt caatattgca ttgcttcac 120
 tcctcaagat ctcttcagct gttgtatctt gtcttgcttc cacattttca gtcccaatat 180
 ccattctacgt gttcaccatg ccattgccat accttggtgt tgctcctct cttccaacag 240
 gctttatggc aggggccatt atcctcattt tgggcttact catttatgct tggaccctt 300
 caaatggttc ctcgggtgct tccttctcaa cttcctccac ctagagaggc tagaatgagt 360
 tgacatgtca ttgcagatag tacaacacca caaggaacta attcaggttc gcttttagga 420
 gacggctata agaaggagaa agaaataggg cgttcttgta agttgtaata gttgttcgta 480
 agcatttttt atgagctaag cttaagtaag aaagagacta gactatagat agaacagggt 540
 ccaagttcaa tttttatgta agctaaggaa agtaaataga gaataaaagt cactttgttg 600
 acagaggaaa tgatattgga ccatttggtat gcaaaaaaaa aaaaaaa 647
 <210> 3
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Glycine max
 <400> 3
 Asp Gly Ala Ala Cys Phe Leu Asn Phe Gly Thr Leu Ser Ser Gly Cys
 1 5 10 15
 Asp Gly Ala Pro Leu Leu Pro Leu Leu Phe Ile Ile Val Asn Ile Gly

20 25 30
 Phe Asn Ile Ala Leu Leu His Leu Leu Lys Ile Ser Ser Ala Val Val
 35 40 45
 Ser Cys Leu Ala Ser Thr Phe Ser Val Pro Ile Ser Ile Tyr Val Phe
 50 55 60
 Thr Met Pro Leu Pro Tyr Leu Gly Val Ala Ser Ser Leu Pro Thr Gly
 65 70 75 80
 Phe Met Ala Gly Ala Ile Ile Leu Ile Leu Gly Leu Leu Ile Tyr Ala
 85 90 95
 Trp Thr Pro Ser Asn Gly Ser Ser Gly Ala Ser Phe Ser Thr Ser Ser
 100 105 110
 Thr

<210> 4
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 4

Met Leu Ser Val Pro Lys Ser Pro Phe Leu Ile Val Gly Ile Leu Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Met Ala Ala Ala Ala Asn Leu Ser Gly
 20 25 30
 Pro Ser Thr Thr Val Leu Ser Gln Arg Lys Pro Asn Thr Arg Met Tyr
 35 40 45
 Ser Cys Ser Ser Arg Cys Asn Arg Gln Cys Gly Lys Val Arg Ser Ala
 50 55 60
 Phe Val Leu Ile Phe Cys Gly Ser Gly Ala Ala His Ser Leu Asn Glu
 65 70 75 80
 Ala Gly Val Leu Trp Ile Leu Leu Met Val Leu Ser Phe Leu Leu Gln
 85 90 95
 Gly Ala Gly Thr Val Leu Lys Glu Val Ile Phe Ile Asp Ser Gln Arg
 100 105 110
 Arg Leu Lys Gly Ala Ser Leu Asp Leu Phe Ile Val Asn Ser Tyr Gly
 115 120 125
 Ser Ala Phe Gln Ala Ile Cys Ile Ala Leu Leu Leu Pro Phe Leu Ser
 130 135 140
 Lys Leu Trp Gly Ile Pro Phe Asn Gln Leu Gly Thr Tyr Leu Lys Asp
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Cys Phe Leu Asn Asn Gly Thr Ile Thr Lys Gly Cys Asp
 165 170 175
 Gly Ala Pro Phe Leu Pro Leu Leu Phe Val Ile Met Asn Ile Gly Tyr
 180 185 190
 Asn Ile Ala Leu Leu Arg Leu Leu Lys Ile Ser Ser Ala Val Val Ser
 195 200 205
 Cys Leu Ala Ser Thr Val Ser Val Pro Ile Ala Val Phe Leu Phe Thr
 210 215 220
 Met Pro Leu Pro Tyr Leu Gly Val Ala Ser Ser Leu Pro Lys Gly Phe
 225 230 235 240
 Met Gly Gly Thr Ile Ile Leu Val Leu Gly Met Ile Leu Tyr Ser Trp
 245 250 255
 Thr Pro His Gly Ala Asn Ser Ser His Thr Asp Ser Val Ile Pro Ser
 260 265 270
 Pro Pro Pro Thr
 275

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência iniciadora
 <400> 5
 cccggggctc gcgttagctc cactc
 <210> 6

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência iniciadora
 <400> 6
 ggcgcgcctg catctgtgac agttccag 28
 <210> 7
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência iniciadora
 <400> 7
 acgtctgcag cgggtcagag ttggcttc 28
 <210> 8
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência iniciadora
 <400> 8
 agctctgcag gctaactttg tgagggttg 29
 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sequência iniciadora
 <400> 9
 tgcaggcgcg cctgcctctg tg 22