

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

(21) **PI 0713503-3 A2**

(22) Data de Depósito: 16/06/2007
(43) Data da Publicação: 13/03/2012
(RPI 2149)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/82
C07K 14/415
A01H 5/00
A01H 5/10

(54) **Título:** PROMOTOR SINTÉTICO INDUZÍVEL POR PATÓGENO

(30) **Prioridade Unionista:** 22/06/2006 DE 10 2006 029 129.8

(73) **Titular(es):** KWS Saat AG

(72) **Inventor(es):** Klaus Schmidt

(74) **Procurador(es):** Dannemann , Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT DE2007001075 de 16/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/147395de 27/12/2007

(57) **Resumo:** PROMOTOR SINTÉTICO INDUZÍVEL POR PATÓGENO. A presente invenção refere-se a um promotor sintético que pode ser induzido por patógeno que é apropriado para regular a transcrição de um ácido nucléico e que abrange um promotor mínimo, caracterizado pelo fato de que o promotor mínimo apresenta um motivo de sequência a) dbrmwa ou b) twccmt, que está disposto a jusante de uma área TATA e antes de um ponto inicial de transcrição disposto no promotor mínimo, no qual inicia a transcrição do ácido nucléico a ser regulado.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROMOTOR SINTÉTICO INDUZÍVEL POR PATÓGENO**".

A presente invenção refere-se a um promotor sintético que pode ser induzido por patógeno que é apropriado para regular a transcrição de um ácido nucléico e que abrange um promotor mínimo. Além disso, a presente invenção refere-se a uma célula vegetal transgênica, bem como a plantas transgênicas. A presente invenção refere-se, além disso, a um processo para preparação de uma planta resistente em relação a patógenos.

Para a elaboração de plantas que são resistentes em relação a patógenos como fungos, vírus, bactérias e nematódeos, são conhecidos diferentes processos. Alguns desses processos utilizam a reação hipersensitiva (HR) das plantas, sendo que ela, na posição de contato direto entre patógeno e plantas leva à formação de necroses. Em consequência da HR, nas células adjacentes é introduzido um amplo espectro de medidas de segurança contra patógenos que inibe o avanço do patógeno no tecido da planta.

A HR pode ocorrer de acordo com a expressão dos genes efetores, como por exemplo, genes não virulentos de um patógeno e interação com o produto de um gene de resistência correspondente (gene-R). O gene-R aqui pode estar presente na planta ou pode ser introduzido no genoma da respectiva planta por meio de métodos da engenharia genética (Stuiver et al. 1998, Keller et al., 1999, Balbahri et al., 2001). Além disso, uma superexpressão ou auto-ativação de genes-R pode levar ao início de uma HR (Tao et al., 2000, Tang et al., 1999, Bendahmane et al., 2002, Howles et al., 2005). Por meio da superexpressão de um gene-R é ultrapassado um valor-limite que leva à ativação de uma cascata de sinal a qual normalmente só é ativada na presença do patógeno ou de seu produto genético não virulento. Pela ativação desta cascata pode ser obtida uma resistência amplamente efetiva contra patógenos (Oldroyd e Staskawicz, 1998, Tang et al. 1999, Tao et al., 2000, Howles et al., 2005). São denominados genes-R auto-ativos aqueles genes-R que foram modificados de modo tal que para ativar a cascata de sinal não precisa mais a presença do patógeno/ produto de gene não virulento e, simultaneamente, um reduzido nível de expressão em compara-

ção com a forma não modificada, é suficiente para ativar a cascata de sinal.

Stuiver et al. (1998) podem mostrar que a transformação do gene-Avr9 do fungo fitopatogênico *Cladosporium fulvum* sob controle do promotor Gst1 da batata que pode ser induzido por patógenos em plantas de
 5 tomateiros que portam o correspondente gene-Cf9, produz uma resistência amplamente efetiva contra fungos. Uma resistência em relação aos oomicetos *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* pôde ser obtida em *Nicotiana tabacum*, depois que ou o elicitor Cryptogein de *P. cryptogea* ou o elicitor bacteriano popA da bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum* foi transfor-
 10 mado em *N. tabacum*. Ambos os genes estavam sob controle do promotor hsr203J de *N. tabacum* que pode ser induzido por patógenos (Keller et al., 1999, Belbahri et al., 2001).

O sistema de ativação da HR exige rigoroso controle da expressão do gene efector no local da infecção. Em expressão não controlada, a
 15 expressão do gene efector causa efeitos negativos sobre o crescimento da planta e, com isto, sobre a produção de plantas de cultura (Stuiver and Custers, 2001). Uma expressão controlada pode ocorrer, sobretudo, pela escolha de apropriados promotores que podem ser induzidos por patógenos. Estes, em condições de não-contaminação não deveriam permitir nenhuma ou
 20 apenas uma reduzida expressão, no entanto, no caso de infestação no local da infecção, deveriam provocar uma expressão nitidamente superior. Após transformação de duas formas auto-ativas diferentes do gene L6 de resistência à ferrugem do linho (*Linum usitatissimum*) em linho sob controle do promotor *Fis1* do linho, natural, que pode ser induzido por ferrugem, foi pos-
 25 sível detectar dois fenótipos. Por um lado, plantas de crescimento normal que não apresentaram resistência melhorada em relação aos patógenos, por outro lado, plantas de pequeno porte com larga resistência aos patógenos (Howles et al., 2005). Estes resultados mostram que, dependendo da forma empregada do gene-R auto-ativo chega-se a uma atividade do promotor que
 30 já pode estar situada acima do valor-limite da indução da cascata de sinal, enquanto nas plantas fenotipicamente discretas a indução do promotor *Fis1* não é suficiente para alcançar o valor-limite. A especificidade do promotor

Fis1 natural não é, pois, suficiente para obter uma resistência amplamente eficaz contra patógenos sem efeitos negativos sobre o crescimento das plantas.

Promotores naturais que podem ser induzidos por patógenos
5 apresentam freqüentemente uma atividade demasiadamente inespecífica e são ativados por inúmeros estímulos, de modo que seu uso para a expressão dos genes efetores acima mencionados não têm sentido, já que uma ativação da HR também pode ocorrer sob condições de não-infecção. Esta falta de densidade dos promotores conduz a uma interferência do crescimento das plantas e, assim, a uma redução do produto de colheita em plantas de cultura. À vista disso, foram desenvolvidos promotores sintéticos con-
10 tendo motivos seqüenciais (elementos cis-reguladores) de promotores naturais que podem ser induzidos por patógenos, que são relevantes para a indução patogênica. Motivos seqüenciais para outros estímulos são, por outro lado, descartados. Os elementos cis-reguladores foram clonados a jusante de um promotor mínimo, com o que é produzido um promotor funcional que em comparação com os promotores naturais apresenta uma especificidade aumentada, a partir dos quais foram isolados os elementos cis-reguladores respectivos (Rushton et al., 2002). Como promotor mínimo, para plantas di-
20 cotiledôneas, foi usada a faixa -46 até +8 do gene 35S do *Cauliflower Mosaic Virus* (vírus do mosaico da couve-flor). Além disso, o uso de um promotor mínimo a partir de um promotor natural do qual foi clonado o respectivo elemento cis-regulador, é conhecido (Perl-Treves et al., 2004). Para plantas monocotiledôneas, é descrito o uso do promotor mínimo do gene Act-1 do
25 arroz (Lü et al., 2000).

Embora os promotores sintéticos descritos sejam superiores aos promotores naturais, estes apresentam ainda atividades secundárias também em casos de não-infestação. Esta atividade secundária oscila entre os tipos de plantas isolados. Assim, embora possa ser detectada em todos os
30 tipos de plantas até agora pesquisadas uma possibilidade de indução patogênica, são observadas oscilações da intensidade da indução e da atividade absoluta dos promotores. Em virtude de uma atividade secundária muito for-

te em tecidos não infestados, só pode ser ainda identificada uma reduzida capacidade de indução patogênica como quociente da atividade promotora no tecido infestado dividido pela atividade promotora no tecido não-infestado.

5 Pelo nível da atividade secundária de um promotor sintético, até agora, só foram responsabilizados até agora os elementos cis-reguladores empregados. Estes possuem grande influência sobre a intensidade dos promotores (Rushton et al., 2002). Até agora a influência dos promotores mínimos foi pouco pesquisada. De conformidade com os dados da literatura,
10 o promotor mínimo só possui uma influência muito reduzida sobre a regulação da atividade do promotor (Singh, 1998). Bhullar et al. (2003) no entanto, pôde determinar uma nítida redução da atividade do promotor do promotor 35S, quando o promotor mínimo (-46 até +1) foi permutado por promotores mínimos de plantas heterólogas. Estas diferenças conduzem de volta a seqüências diferenciadas das caixas TATA enquanto, de acordo com sua opi-
15 nição, as áreas flanqueadas da caixa TATA do promotor mínimo não foram relevantes para a atividade do promotor.

Tarefa da presente invenção é, pois, prover um promotor sintético que pode ser induzido por patógenos, com uma reduzida atividade secundária.
20

A tarefa imposta é solucionada de acordo com a invenção por meio de um promotor sintético com um promotor mínimo, que pode ser induzido por patógenos, sendo que o promotor mínimo apresenta um motivo de seqüências

25 a) dbrmwa ou
b) twcccm

que está disposto a jusante de uma área TATA e antes de um ponto inicial de transcrição disposto no promotor mínimo no qual se inicia a transcrição do ácido nucléico a ser regulado. Com isto, o motivo de seqüências dbrmwa
30 é apropriado sobretudo para plantas dicotiledôneas e o motivo de seqüências twcccm para plantas monocotiledôneas.

Os símbolos dos motivos de seqüências têm, aqui, o seguinte

significado:

d = nucleotídeo a ou g ou t/u

b = nucleotídeo c ou g ou t/u

r = nucleotídeo g ou a

5 m = nucleotídeo a ou c

w = nucleotídeo a ou t/u

a = nucleotídeo a

t = nucleotídeo t

c = nucleotídeo c

10 No sentido da presente invenção um "promotor mínimo" é uma
seqüência de DNA de um promotor, necessária para a função promotor.
Nesta seqüência de DNA fatores gerais de transcrição como, por exemplo,
TFII-D, TFII-A, TFII-B, TFII-E e TFII-F podem ligar e formar a plataforma pa-
ra a ligação do complexo da polimerase-RNA II/TFII-F. Como a transcrição
15 do DNA na mRNA inicia nesta área, o ponto de partida da transcrição (TS)
situa-se no interior do promotor mínimo e é fixado como posição +1. O pro-
motor mínimo transforma o TS e pode chegar, por exemplo, da posição -50
até a posição +15. A chamada caixa TATA é freqüentemente encontrada
próxima à posição -30, que nem sempre está presente em todos os promo-
20 tores. A caixa TATA é uma faixa de uma seqüência de bases timina e adeni-
na. A caixa TATA é um ponto de ligação para a proteína (TBP) que liga a
caixa TATA.

São chamados "promotores sintéticos" aqueles promotores não
presentes na natureza, que são compostos de vários elementos e que con-
25 têm um promotor mínimo bem como apresentam pelo menos um elemento
cis-regulador a jusante do promotor mínimo que serve de ponto de ligação
para fatores de transcrição especiais. Promotores sintéticos são concebidos
de acordo com as exigências e são induzidos ou reprimidos por diferentes
fatores.

30 "Derivados" de um promotor são versões encurtadas ou alonga-
das ou versões idênticas por secções destes promotores ou homólogos com
propriedades idênticas, modificadas ou singulares.

A expressão "homologia" significa, aqui, uma homologia de pelo menos 70% no plano-DNA que possa ser determinada de acordo com processos conhecidos, por exemplo, a comparação computadorizada de seqüências (Altschul, S.F.et al., 1990).

5 O promotor sintético que pode ser induzido por patógenos, de acordo com a invenção, após transformação biolítica transiente no tecido foliar das respectivas plantas conduz a uma atividade básica reduzida em comparação com promotores com um promotor mínimo, usualmente empregados, como o promotor mínimo 35S, em plantas dicotiledôneas e com o
10 promotor mínimo milho-ubi1 empregado em plantas monocotiledôneas. Além disso, verificou-se que nos promotores sintéticos que podem ser induzidos por patógenos também a taxa de indução é mais elevada.

Assim, os promotores sintéticos que podem ser induzidos com patógenos de acordo com a invenção podem ser empregados para a obten-
15 ção de plantas transgênicas, que apresentam elevada resistência em relação a inúmeros patógenos como fungos, oomicetos, bactérias, vírus, insetos e nematódeos.

Os motivos de seqüências dbrmwa e twccmt situam-se em determinada orientação na cadeia de genes do códon entre a caixa TATA e o
20 ponto de partida da transcrição e podem estar presentes duas ou mais vezes. Seqüências preferidas para promotores mínimos são indicadas nas SEQ ID NOS: 1 até 9.

Elementos cis-reguladores para preparação de promotores sintéticos que podem ser induzidos por patógenos são, sobretudo, todos aqueles
25 elementos que estão presentes em promotores naturais que são induzidos por patógenos e que lá são responsáveis pela indução patogênica. Sua identificação é descrita por Rushton et al. (2002).

Elementos cis-reguladores preferidos para preparação de promotores sintéticos com uso dos promotores mínimos de acordo com a invenção são também descritos na patente WO 00/29592. Dos elementos cis-reguladores ali mencionados é adequada, sobretudo, a caixa-D (SEQ ID NO:
30 10), particularmente na combinação 2xS/2xD (SEQ ID NO:11) bem como o

elemento Gst1, de preferência na combinação com 4xGst1 (SEQ ID NO: 12).

5 Às combinações dos elementos cis vantajosas pertencem em geral combinações da caixa-D (SEQ ID NO: 10) com a caixa-S ou o elemento-Gst1. Particularmente vantajosas, além da combinação 2xS/2xD (SEQ ID NO: 11) acima mencionada, são as combinações 2xS/4xD (SEQ ID NO: 13); 4xS/2xD (SEQ ID NO: 14) e 2xGst1/2xD (SEQ ID NO: 15). A combinação do elemento 2xS/4xD (SEQ ID NO: 13) com o promotor mínimo de acordo com SEQ ID NO: 2, em batatas transgênicas, após contaminação com *Phytophthora infestans*, mostrou um aumento médio da atividade do gene repórter próximo ao fator 253.000 em comparação com o controle não contaminado.

10 Se o elemento 4xS/2xD (SEQ ID NO: 14) foi clonado antes do promotor mínimo, foi possível determinar um aumento médio da atividade do gene repórter por volta do fator 2.892. No elemento 2xGst1/2xD (SEQ ID NO: 15) foi alcançado um aumento médio por volta do fator 2.967 em comparação com o controle.

15 Com os promotores de acordo com a invenção é possível produzir plantas transgênicas que podem ser regeneradas para plantas completas com aperfeiçoadas propriedades de repulsa em relação aos patógenos. Nas sementes de tais plantas transgênicas estão, então, igualmente contidos os promotores da presente invenção. Esta invenção não está restrita a determinadas espécies de plantas.

20 A presente invenção abrange também um processo para a preparação de uma planta resistente em relação a patógenos, em que em uma célula da planta é introduzido um gene apropriado para produzir uma defesa contra patógenos que está sob controle de um promotor sintético que pode ser induzido por patógenos, e, subsequenteemente pode regenerar uma planta a partir desta célula, caracterizado pelo fato de que no promotor sintético, que pode ser induzido por patógenos, é tratado um promotor sintético que pode ser induzido por patógenos, tal como acima descrito.

30 Exemplos

A figura 1 mostra uma comparação de seqüências entre os promotores mínimos (SEQ ID NOS: 1 até 7) preferidos para plantas dicotiledô-

neas com as áreas TATA conservadas e os motivos dbrmwa bem como os pontos de corte PstI e XhoI empregados para a clonagem no plasmídeo pMS23luc+.

5 A figura 2 mostra uma comparação de seqüências entre os promotores mínimos (SEQ ID NOS: 8 e 9) preferidos para plantas monocotiledôneas, que foram empregados para a transformação transiente de folhas do trigo. Além da área TATA, é mostrado o motivo seqüencial twcccmmt como área conservada.

10 Foi possível mostrar que os promotores mínimos StGst (SEQ ID NO:6), NtTGAA (SEQ ID NO:5), StPSBR (SEQ ID NO:7), NpCABE (SEQ ID NO:2), NtRBS (SEQ ID NO:3), NpATP2 (SEQ ID NO:1) e Nt5EAS (SEQ ID NO: 4) apresentam uma atividade nitidamente mais reduzida (< 70%) em comparação com o promotor mínimo 35S.

15 A figura 3 mostra uma vista sobre as atividades médias dos genes repórteres de plantas transgênicas de batata não infectadas, com um promotor sintético consistindo do elemento 4xGst 1 (SEQ ID NO:12) e os promotores mínimos mencionados, clonados antes do gene luciferase de *Photinus pyralis* como gene repórter (RLU = unidades relativas de luz). Linhas transgênicas, estáveis com os promotores mínimos, que portam o motivo seqüencial dbrmwa, mostraram sob condições de controle uma expressão do gene repórter nitidamente reduzida em comparação com o promotor mínimo 35S. A atividade média mais reduzida foi alcançada com uso do promotor mínimo do gene NpATP2 (SEQ ID NO:1). Nestas plantas só foi possível medir 9,7% da atividade média do promotor mínimo 35S. Com uso
20 dos promotores mínimos StPSBR (SEQ ID NO:7), NtTGAA (SEQ ID NO: 5) ou StGst (SEQ ID NO: 6) foram medidos 18% da atividade do promotor mínimo 35-S, no promotor mínimo NtRBS (SEQ ID NO: 3) 26%, no promotor mínimo NpCABE (SEQ ID NO: 2) 39% e no promotor mínimo Nt5EAS (SEQ ID NO:4) 41%.

30 Para o técnico, a preparação de "Konstrukte" apropriados para transformação de plantas com os promotores de acordo com a invenção não é problema. Assim é possível preparar, por exemplo, o vetor binário

p4xGst1-luc-kan (figura 8), o qual foi utilizado para a transformação estável de plantas de batata do tipo "Báltica". Este vetor é um derivado do vetor binário pGPTV (Becker et al., 1992). O vetor binário p4xGst1luc-kan porta o gene luciferase de *Photinus pyralis* sob controle do promotor sintético p4xGst1:35S do promotor mínimo (Rushton et al., 2002). O plasmídeo contém, como sequência de terminação, o terminador do gene da nopalinosintase de *Agrobacterium tumefaciens*. O cassete de expressão descrito está localizado sobre o T-DNA juntamente com um cassete de expressão funcional como marcador da seleção para o gene da neomicina-fosfotransferase (nptII). A neomicina-fosfotransferase confere resistência às plantas transgênicas em relação à canamicina ou paromicina. A fim de permutar o promotor mínimo 35S pelos promotores mínimos acima descritos, o vetor binário p4xGst1luc-kan foi digerido com XhoI/SalI, com o que o promotor mínimo 35S foi afastado, porém o tetrâmero do elemento Gst1 fica mantido. O ponto de corte-SalI foi preenchido com auxílio da enzima "Klenow Polymerase" e dNTP, a fim obter uma terminação cega ("blunt-end"). Os promotores mínimos, clonados no plasmídeo pMS23luc+, foram recortados com PstI/XhoI-Verdau e ligados no vetor binário e subsequentemente transformados em *E.coli*. Vetores binários com a nova sequência foram transformados no filo agrobacteriano GV3101::pMP90 (Koncz e Shell, 1986) (An, 1987) e selecionados com uso do antibiótico canamicina (50 mg/l). As agrobactérias transgênicas foram empregadas para a transformação de batatas do tipo "Báltica" (Dietze et al., 1995).

A figura 4 mostra uma vista sobre as induções obtidas após infecção *in vitro* de plantas transgênicas de batatas, estáveis, com um promotor sintético consistindo do elemento 4xGst1 (SEQ ID NO:12) e promotores mínimos mencionados. A infecção ocorreu em plantas *in vitro* com uma suspensão de zoósporos de *Phytophthora infestans*.

Em diferentes ocasiões após a inoculação, foram retiradas amostras de folhas de plantas *in vitro*, o peso das amostras foi determinado e foram adicionados 10 volumes de tampão 1xCCLR (Promega, Mannheim). O material foi homogeneizado no tampão, sobre gelo, com auxílio de um ho-

mogeneizador RW20 (IKA Labortechnik, Staufen). O produto homogeneiza-
 do foi clarificado por centrifugação a $>10.000 \times g$ durante 10 minutos e 10 μ l
 do sobrenadante foram misturados com 50 μ l do substrato LAR (Promega,
 Mannheim) em um tubinho de medição de luminosidade e a emissão de luz
 5 foi determinada como medida da atividade da luciferase em um luminímetro
 (Sirius, Berthold Detection System GmbH, Pforzheim). Para comparação
 foram usadas plantas *in vitro* que foram cultivadas sob mesmas condições e
 tratadas ilusoriamente com água em vez de zoósporos. O valor médio dos
 quocientes de cinco linhas independentes da atividade da luciferase nas va-
 10 riantes infectadas para tratamento ilusório fornece através da infecção a in-
 dução do promotor sintético. Como pode ser visto na figura 7, com uso do
 promotor mínimo 35S só foi possível obter uma indução máxima da atividade
 da luciferase de fator dez, 72 horas após a infecção. Em contrapartida, todos
 os novos promotores mínimos mostraram uma indução nitidamente melho-
 15 rada. A indução mais forte após infecção com um fator 395 foi 72 hpi com o
 promotor mínimo StPSBR (SEQ ID NO:7). De modo geral, a indução pôde
 ser melhorada com o uso dos novos promotores mínimos no momento 72
 hpi com o fator 3,5 no promotor mínimo StGst (SEQ ID NO:6) até fator 39,5
 no promotor mínimo StPSBR (SEQ ID NO:7) em comparação com o promo-
 20 tor mínimo 35S. É interessante observar que entre os promotores mínimos
 existem nítidas diferenças na cinética da indução após inoculação patogêni-
 ca. Enquanto no uso do promotor mínimo 35S é possível medir a indução
 mais distinta 72 hpi, isto também se aplica no uso do promotor mínimo
 StPSBR, NtTGAA, StGst, NtRBS bem como NpTP2. Usando o promotor
 25 NpCABE e Nt5EAS, ao contrário, é possível determinar uma forte ativação já
 no período 9 hpi e a indução no período restante de análises permanece
 aproximadamente no nível alcançado.

A preferência dos novos promotores mínimos também foi mos-
 trada após a fusão com a combinação dos elementos-cis 2xS/2xD. Para isto,
 30 plantas de batatas foram transformadas de modo estável com os vetores
 binários p2xS/2xDluc-kan, p2xS/2xDNpCABEluc-kan e p2xS/2xDNtTGAAluc-
 kan. Os vetores binários foram elaborados com a eliminação do elemento

4xGst1 dos vetores binários acima mencionados com os novos promotores mínimos e com o elemento 4xGst1 com Bcl/Eco1471-Verdau e a incorporação do elemento 2xS/2xD (SEQ ID NO:11) como fragmento Bcl/Eco321. Vetores binários com a nova sequência foram transformados no filo agrobacteriano GV3101::pMP90 (Koncz e Schell, 1986)(An, 1987) e selecionados com uso do antibiótico canamicina (50 ml/l). As agrobactérias transgênicas foram empregadas para a transformação de batatas do tipo "Báltica" (Dietze et al., 1995). Rebentos transgênicos foram multiplicados e inoculados sob condições *in vitro* com uma suspensão de zoósporos (50.000 esporos/ml) de *Phytophthora infestans*. Foi possível mostrar que também com uso do elemento cis-regulador 2xS/2xD (SEQ ID NO:11) pôde ser obtida uma atividade secundária reduzida com os promotores mínimos da presente invenção em comparação com o promotor mínimo 35S (figura 5). Simultaneamente, foi possível observar uma indução mais forte dos promotores sintéticos após inoculação das batatas transgênicas com *P. infestans* (figura 6). O reforço da indução, em um momento posterior (3 dias após infecção = 3 dpi) não se apresentou tão nitidamente como observado com o uso do elemento 4xGst1. 2 dias após a infecção, no entanto, foi possível observar com uso dos novos promotores mínimos uma indução nitidamente mais forte após infestação patogênica. Assim, o uso destes promotores mínimos tem como consequência um aperfeiçoamento da cinética do promotor sintético, de modo que a reação à infestação patogênica se manifesta mais cedo, em comparação com os promotores sintéticos com uso do promotor mínimo 35S.

A figura 7 mostra a comparação da atividade normalizada dos promotores sintéticos induzíveis por patógenos consistindo no elemento 2xS/2xD (SEQ ID NO:11) e dos promotores mínimos ubi1 (promotor de comparação), TaPAL (SEQ ID NO:9) e TaACS (SEQ ID NO:8) após transformação biolítica em folhas primárias do trigo tipo "Taifun". Como pode ser reconhecido, os novos promotores mínimos TaPAL e TaACS apresentam reduzida atividade básica em comparação com o promotor mínimo ubi1. Enquanto com o promotor mínimo ubi1 foi medida uma atividade normalizada de 0,17, com uso do promotor mínimo TaPAL foi possível reduzir esta para

0,072 e com uso do promotor mínimo TaACS foi possível reduzir para 0,13.

A figura 9 mostra o plasmídeo pubiTATARucII que contém uma cDNA com o gene luciferase de *Renilla reniformis*, tal como contido no plasmídeo pRL-zero disponível no comércio. A cDNA está sob controle do promotor mínimo ubi1. O promotor mínimo ubi1 abrange a área seqüencial de – 45 até +76 relativa ao ponto de partida da transcrição. A fim de aumentar a força da expressão, o primeiro íntron do gene ubi1 no seu contexto natural no plasmídeo está contido antes do gene repórter. O plasmídeo foi utilizado para clonagem do elemento cis-regulador 2xS/2xD (SEQ ID NO:11) a fim de obter, com isto, um promotor sintético induzível por um patógeno. O promotor mínimo ubi1 foi permutado pelos novos promotores mínimos a fim de aperfeiçoar as propriedades dos promotores sintéticos.

Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Listagem de Sequência

```

<110> KWS SAAT AG
      Schmidt, Klaus

5  <120> PROMOTOR SINTÉTICO INDUZÍVEL POR PATÓGENO
    <130> KWS 0111 PCT
    <160> 15
    <170> versão de Patente 3.3
    <210> 1
10  <211> 69
    <212> DNA
    <213> Nicotiana plumbaginifolia
    <220>
    <221> misc_feature
15  <222> (1)..(8)
    <223> PstI Sequência de identificação
    <220>
    <221> TATA_signal
    <222> (19)..(24)
20  <220>
    <221> misc_feature
    <222> (32)..(37)
    <223> dbrmwa
    <220>
25  <221> misc_feature
    <222> (62)..(69)
    <223> XhoI Sequência de identificação
    <400> 1
    aactgcagtg ggctcttgat atatcagctc ttcacaaacc ctagcagtct ctttctctcc 60
30  tctcgagtt 69
    <210> 2
    <211> 67
    <212> DNA
    <213> Nicotiana plumbaginifolia
35  <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(8)
    <223> PstI Sequência de identificação
    <220>
40  <221> TATA_signal
    <222> (19)..(24)
    <220>
    <221> misc_feature
    <222> (31)..(36)
45  <223> dbrmwa
    <220>
    <221> misc_feature
    <222> (60)..(67)
    <223> XhoI Sequência de identificação
50  <400> 2
    aactgcagta aagccattta tatacactta gtgcaaagcc catgaaactc aagcctcaac 60
    tcgagtt 67
    <210> 3
    <211> 67
55  <212> DNA
    <213> Nicotiana tabacum
    <220>
    <221> Misc_feature
    <222> (1)..(8)
60  <223> PstI Sequência de identificação

```

```

<220>
<221> TATA_signal
<222> (18)..(25)
<220>
5 <221> Misc_feature
<222> (33)..(38)
<223> dbrmwa
<220>
<221> Misc_feature
10 <222> (60)..(67)
<223> XhoI Sequência de identificação
<400> 3
aactgcagcc ttatcattat atataggggtg gtgggcaact atgcaatgac catattggac 60
tcgagtt 67
15 <210> 4
<211> 69
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum
<220>
20 <221> misc_feature
<222> (1)..(8)
<223> PstI Sequência de identificação
<220>
<221> TATA_signal
25 <222> (24)..(31)
<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(43)
<223> dbrmwa
30 <220>
<221> misc_feature
<222> (62)..(69)
<223> XhoI Sequência de identificação
<400> 4
35 aactgcagca gtttaatgta cattacatat aggttgcgga aaagtatata tatgctcaag 60
actcgagtt 69
<210> 5
<211> 67
<212> DNA
40 <213> Nicotiana tabacum
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(8)
<223> PstI Sequência de identificação
45 <220>
<221> TATA_signal
<222> (19)..(24)
<220>
<221> misc_feature
50 <222> (31)..(36)
<223> dbrmwa
<220>
<221> misc_feature
<222> (60)..(67)
55 <223> XhoI Sequência de identificação
<400> 5
aactgcagta aagccattta tatacactta gtgcaaagcc catgaaactc aagcctcaac 60
tcgagtt 67
60 <210> 6
<211> 67
<212> DNA

```

<213> Solanum tuberosum
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(8)
 5 <223> PstI Sequência de identificação
 <220>
 <221> TATA_signal
 <222> (24)..(30)
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (38)..(43)
 <223> dbrmwa
 <400> 6
 aactgcagag tcaaataata ttttatatta gaataattga atagtcaaac aagaaacttt 60
 15 aacgagt 67
 <210> 7
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Solanum tuberosum
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(8)
 <223> PstI Sequência de identificação
 <220>
 25 <221> TATA_signal
 <222> (26)..(34)
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(41)
 30 <223> dbrmwa
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (68)..(75)
 <223> XhoI Posição de restrição
 35 <400> 7
 aactgcagac catgcaaagt gaaaataaat aattcactact aagtagtgag agcaaagaag 60
 aaaaaagctc gagtt 75
 <210> 8
 <211> 69
 40 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum
 <220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(69)
 45 <223> Minimalpromotor
 <220>
 <221> TATA_signal
 <222> (13)..(20)
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (38)..(44)
 <223> twcccm
 <400> 8
 gcgccacgaa tctataaata ggcaccaacg agcagcttac ccattcatct ccctccctcc 60
 55 ctccgccag 69
 <210> 9
 <211> 149
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum
 60 <220>
 <221> TATA_signal

```

<222> (17)..(23)
<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(48)
5 <223> twcccm
<220>
<221> 5'UTR
<222> (51)..(149)
<400> 9
10 atctgcaggc gctgcctatt taateccttc ccctccctcc attccctcc aagaagagcc 60
acagcttcat ctgcagctac agctcctctt cgtcttcgac acacaagtat ttttcagga 120
caaagatcaa tccagatata catacacct 149
<210> 10
<211> 31
15 <212> DNA
<213> Petroselinum crispum
<220>
<221> potencializador
<222> (1)..(31)
20 <223> BoxD
<400> 10
tacaattcaa acattgttca aacaaggaac c
31
<210> 11
25 <211> 128
<212> DNA
<213> Petroselinum crispum
<220>
<221> potencializador
30 <222> (1)..(128)
<223> Elemento potencializador sintético composto de dímero de BoxS
e BoxD und
BoxD
<220>
35 <221> potencializador
<222> (1)..(25)
<223> BoxS
<220>
<221> potencializador
40 <222> (31)..(55)
<223> BoxS
<220>
<221> potencializador
<222> (61)..(91)
45 <223> BoxD
<220>
<221> potencializador
<222> (98)..(128)
<223> BoxD
50 <400> 11
cagccaccaa acaggaccca gaattctagt cagccaccaa agaggaccca gaattctagt 60
tacaattcaa acattgttca aacaaggaac ctctagttac aattcaaaca ttgttcaaac 120
aaggaacc 128
<210> 12
55 <211> 118
<212> DNA
<213> Solanum tuberosum
<220>
<221> potencializador
60 <222> (1)..(118)

```

```

<223> Elemento potencializador sintético de um tetrômero do
elemento Gst1

<220>
5  <221> potencializador
   <222> (1)..(25)
   <223> BoxGst1
   <220>
10 <221> potencializador
   <222> (32)..(56)
   <223> BoxGst1
   <220>
   <221> potencializador
   <222> (63)..(87)
15 <223> BoxGst1
   <220>
   <221> potencializador
   <222> (94)..(118)
   <223> BoxGst1
20 <400> 12
   ttctagccac cagatttgac caaactctag tttctagcca ccagatttga ccaaactcta 60
   gtttctagcc accagatttg accaaactct agtttctagc caccagattt gaccaaac 118
   <210> 13
   <211> 202
25 <212> DNA
   <213> synthetic
   <220>
   <221> potencializador
   <222> (1)..(202)
30 <223> Elemento potencializador sintético composto de dímero de BoxS
   e do tetrâmero do BoxD
   <220>
   <221> potencializador
   <222> (1)..(25)
35 <223> Box S
   <220>
   <221> potencializador
   <222> (31)..(55)
   <223> Box S
40 <220>
   <221> potencializador
   <222> (61)..(91)
   <223> Box D
   <220>
45 <221> potencializador
   <222> (98)..(128)
   <223> Box D
   <220>
   <221> potencializador
50 <222> (135)..(165)
   <223> Box D
   <220>
   <221> potencializador
   <222> (172)..(202)
55 <223> Box D
   <400> 13
   cagccaccaa agaggaccca gaattctagt cagccaccaa agaggaccca gaattctagt 60
   tacaattcaa acattgttca aacaaggaac ctctagttac aattcaaaca ttgttcaaac 120
   aaggaacctc tagttacaat tcaaacattg ttcaaacaag gaacctctag ttacaattca 180
60 aacattgttc aaacaaggaa cc 202
   <210> 14

```

<211> 188
 <212> DNA
 <213> synthetic
 <220>
 5 <221> potencializador
 <222> (1)..(188)
 <220>
 <221> potencializador
 <222> (1)..(25)
 10 <223> BoxS
 <220>
 <221> potencializador
 <222> (31)..(55)
 <223> BoxS
 15 <220>
 <221> potencializador
 <222> (61)..(85)
 <223> BoxS
 <220>
 20 <221> potencializador
 <222> (91)..(115)
 <223> BoxS
 <220>
 <221> potencializador
 <222> (121)..(151)
 25 <223> BoxD
 <220>
 <221> potencializador
 <222> (158)..(188)
 30 <223> BoxD
 <400> 14
 cagccaccaa agaggaccca gaattctagt cagccaccaa agaggaccca gaattctagt 60
 cagccaccaa agaggaccca gaattctagt cagccaccaa agaggaccca gaattctagt 120
 tacaattcaa acattgttca aacaaggaac ctctagttac aattcaaaca ttgttcaaac 180
 35 aaggaacc 188
 <210> 15
 <211> 130
 <212> DNA
 <213> synthetic
 40 <220>
 <221> potencializador
 <222> (1)..(130)
 <223> Elemento potencializador sintético composto pelo dímero do
 Gst1-Box e do dímero do BoxD
 45 <220>
 <221> potencializador
 <222> (1)..(25)
 <223> Box Gst1
 50 <220>
 <221> potencializador
 <222> (32)..(56)
 <223> Box Gst1
 <220>
 55 <221> potencializador
 <222> (63)..(93)
 <223> Box D
 <220>
 <221> potencializador
 60 <222> (100)..(130)

<223> Box D
<400> 15
5 ttctagccac cagatttgac caaactctag tttctagcca ccagatttga ccaaactcta 60
gttacaattc aaacattggt caaacaagga acctctagtt acaattcaaa cattgttcaa 120
acaaggaacc 130

REIVINDICAÇÕES

1. Promotor sintético que pode ser induzido por patógenos, que é apropriado para regular a transcrição de um ácido nucléico e que abrange um promotor mínimo, caracterizado pelo fato de que o promotor mínimo a-
5 apresenta um motivo de seqüências
a) dbrmwa ou
b) twcccm
que está disposto a jusante de uma área TATA e antes de um ponto inicial de transcrição disposto no promotor mínimo no qual se inicia a transcrição
10 do ácido nucléico a ser regulado.
2. Promotor sintético que pode ser induzido por patógenos de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o motivo de seqüências no promotor mínimo está presente duas ou mais vezes.
3. Promotor sintético que pode ser induzido por patógenos de
15 acordo com a reivindicação 1 ou 2, no qual o promotor mínimo apresenta uma seqüência de nucleotídeos de acordo com uma das SEQ ID NOS: 1-9 ou derivados das mesmas.
4. Promotor sintético que pode ser induzido por patógenos de acordo com uma das reivindicações 1 até 3, que além do promotor mínimo
20 apresenta pelo menos um elemento cis-regulados com uma seqüência de nucleotídeos de acordo com uma das SEQ ID NOS: 10-15.
5. Gene recombinante com um promotor sintético que pode ser induzido por patógenos como definido em uma das reivindicações 1 até 4.
6. Células vegetais nas quais um promotor sintético que pode
25 ser induzido por patógenos como definido em uma das reivindicações 1 até 4 foi integrado no DNA das células vegetais.
7. Plantas transgênicas com uma célula vegetal como definida na reivindicação 6.
8. Sementes de uma planta transgênica como definida na reivin-
30 dicação 7.
9. Processo para preparação de uma planta resistente em relação a patógenos, no qual em uma célula da planta é introduzido um

ácido nucléico apropriado para produzir uma defesa contra patógenos que está sob controle de um promotor sintético que pode ser induzido por patógenos, e, que subsequente-mente pode regenerar uma planta a partir desta célula vegetal, caracterizado pelo fato de que no promotor sintético que pode ser induzido por patógenos trata-se um promotor sintético que pode ser induzido por patógenos como definido em uma das reivindicações 1 até 4.

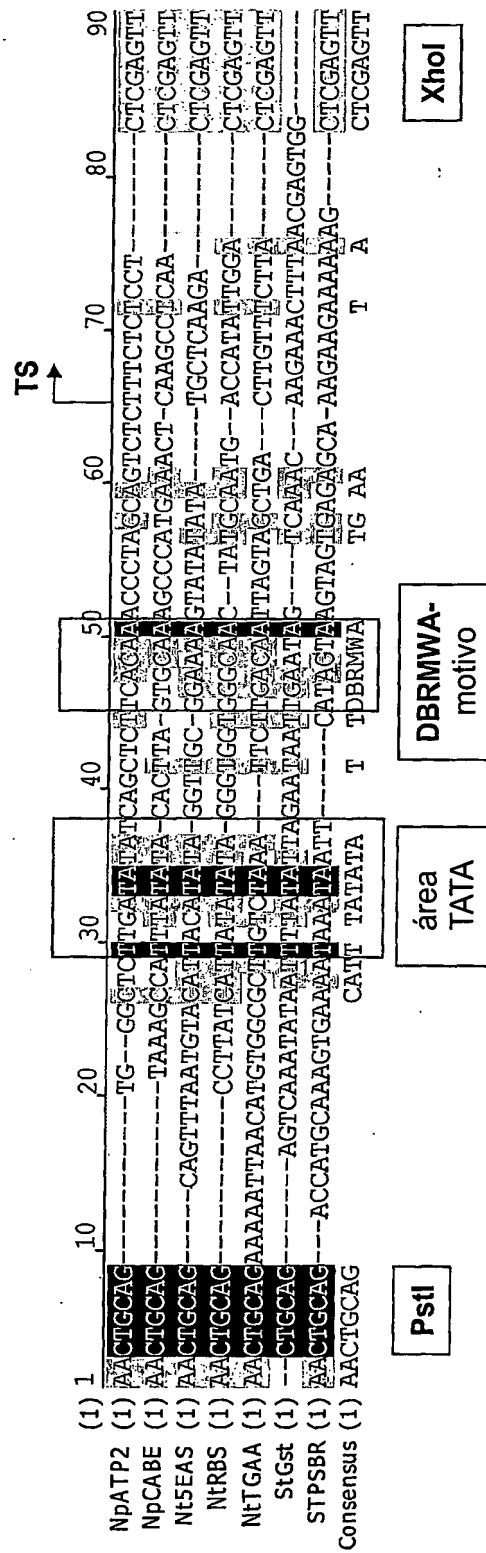


Fig. 1



área
 TATA

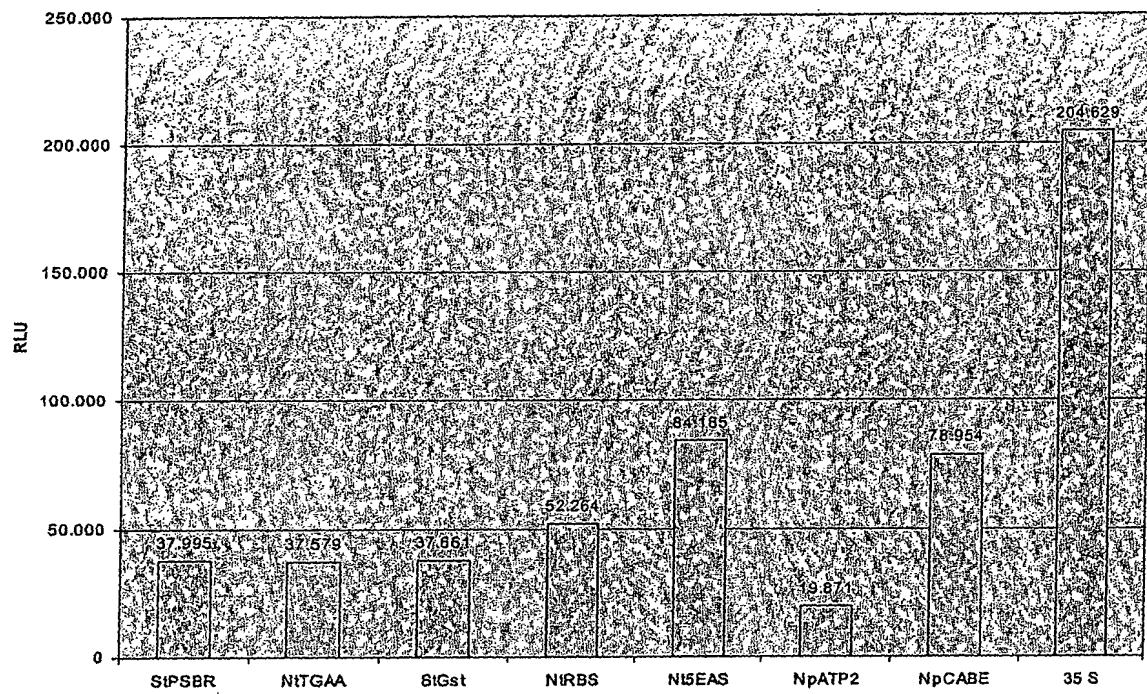


Fig. 3

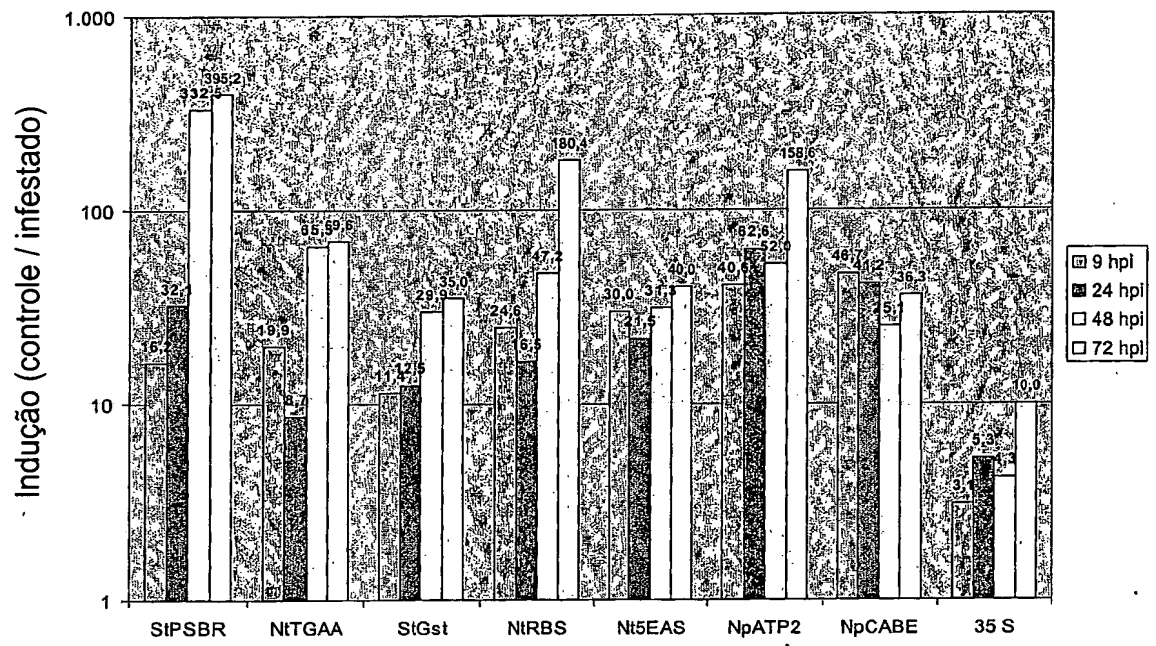


Fig. 4

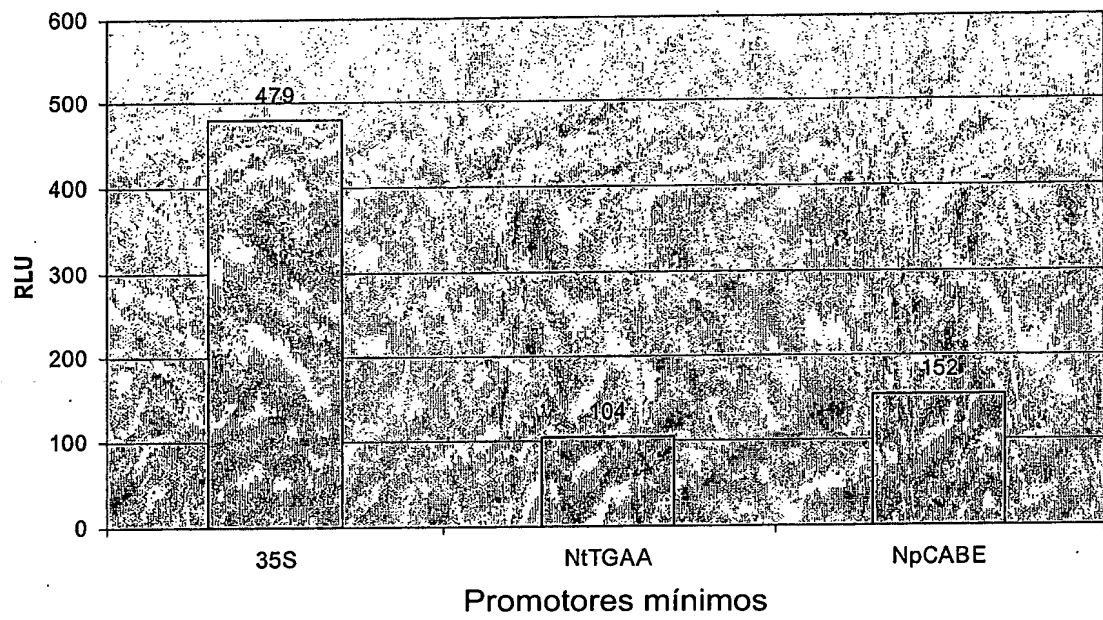


Fig. 5

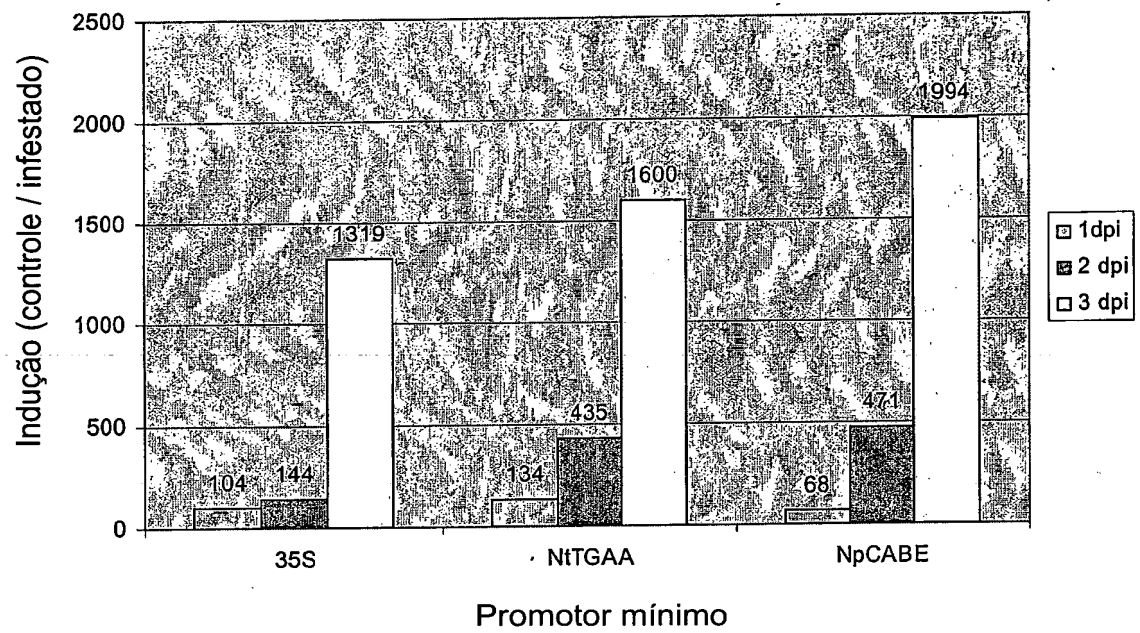


Fig. 6

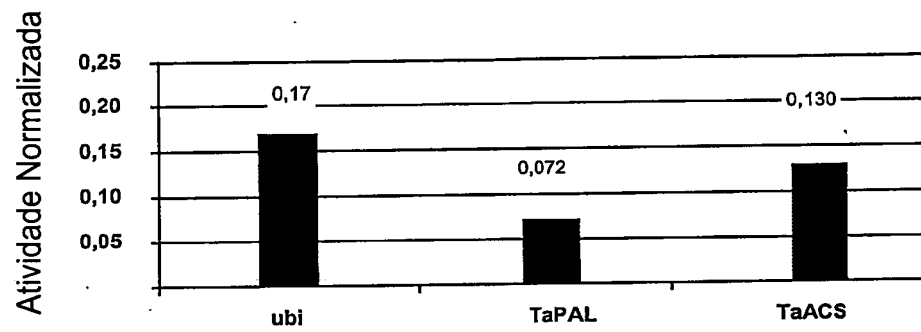


Fig. 7.

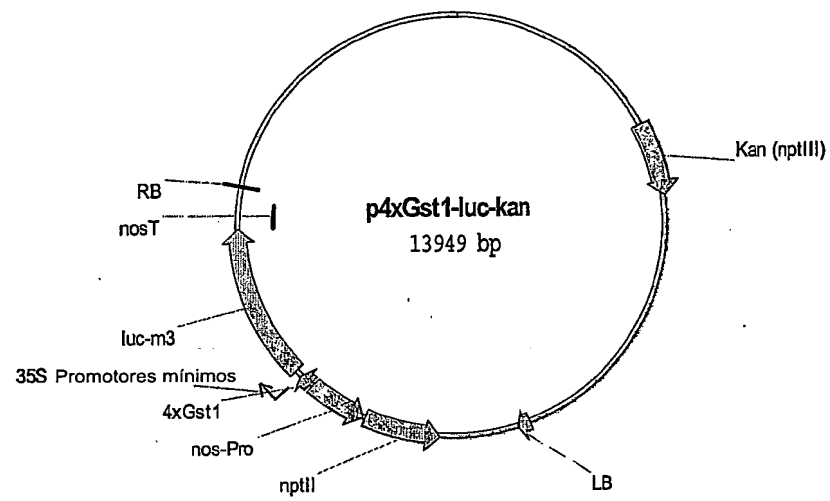


Fig. 8

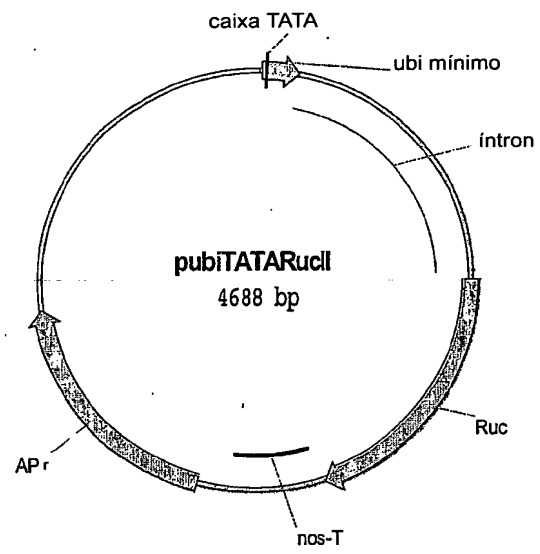


Fig. 9

RESUMO

Patente de Invenção: "PROMOTOR SINTÉTICO INDUZÍVEL POR PATÓGENO".

A presente invenção refere-se a um promotor sintético que pode
5 ser induzido por patógeno que é apropriado para regular a transcrição de um
ácido nucléico e que abrange um promotor mínimo, caracterizado pelo fato
de que o promotor mínimo apresenta um motivo de sequência a) dbrmwa ou
b) twccmt, que está disposto a jusante de uma área TATA e antes de um
ponto inicial de transcrição disposto no promotor mínimo, no qual inicia a
10 transcrição do ácido nucléico a ser regulado.