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

(21) PI 0808373-8 A2

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

(22) Data de Depósito: 04/02/2008
(43) Data da Publicação: 01/07/2014
(RPI 2269)

(51) Int.Cl.:
C12N 15/82

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

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 06/02/2007 US 60/899714

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

(72) Inventor(es): Aaron Wiig, Sumita Chaudhuri, Xiang Huang

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

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008051328 de 04/02/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/095887de 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

Este pedido reivindica o benefício de prioridade de pedido de patente internacional U.S. de número de série 60/899714 depositado aos 06 de Fevereiro de 2007.

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se ao promotor e às seqüências de elemento regulatório que regulam transcrição de genes simulares aos genes tipo MtN3. Os promotores de genes tipo MtN3 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 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

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 cultivo, incluindo nematódeo das 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.

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 possível sem medidas de controle. Embora feijão-soja seja a plantação econômica principal atacada por SCN, parasitas SCN somam no total cinqüenta hospedeiros, incluindo plantações de campo, verduras/hortaliças, plantas ornamentais, e ervas daninhas.

Sinais de dano de nematódeo incluem atrofiamento e 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 ananicadas ou atrofiadas. Infestação de 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 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 desenvolvente 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. 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 morfologicamente 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 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 freqüentemente contaminam semente colhida. Conseqüentemente, 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 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 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 alternação de plantações hospedeiras com plantações não-hospedeiras; usando nematicidas; 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 adjacentemente 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 RB7de *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 A0.3TobRB7 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. 6.703.541 revela clonagem e isolamento de gene P7X de peroxidase de milho e seu promotor, o promotor é intencionado para ser induzível por 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 (cel1)* para produzir plantas capazes de interromperem o ataque de 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 nematicida.

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.

Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 2003/0167507 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.

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 revela uma seqüência 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.

Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 2005/0262585 revela um promotor de fosfo-ribosil-formil-glicinamidina-ribonucleotídeo de feijão-soja e seus fragmentos de deleção, que são intencionados para serem responsivos à infecção por nematódeo.

WO 94/10320 revela o fragmento de promotor Δ0.3TobRB7 de tabaco e seu uso com uma variedade de genes para expressão específica em célula de alimentação de nematódeo.

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

WO 2004/029222 e sua contra-parte US Publicação de Patente 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.

Nenhuns dos promotores específicos para sítio de alimentação ou para raiz acima mencionados estão correntemente em uso em semente 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 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 ácido nucleico em raízes de planta que são suscetíveis ao ataque por nematódeos. Os promotores da invenção são particularmente úteis para tornar plantas de cultivo agrícola resistentes à infestação por nematódeos.

Em outra modalidade, a invenção fornece um promotor compreendendo um polinucleotídeo promotor capaz de mediar expressão específica para raiz e/ou induzível por nematódeo, sendo que o polinucleotídeo promotor é selecionado do grupo de polinucleotídeos consistindo de a) um polinucleotídeo tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3; b) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 748 a 998, ou nucleotídeos 500 a 998, ou nucleotídeos 573 a 922 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1; c) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1637 a 1989 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2; d) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 400 a 609, ou nucleotídeos 260 a 609, ou nucleotídeos 200 a 609 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3; e) um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência com qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d); f) um polinucleotídeo hibridizando sob condições estringentes com qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d); e g) 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 uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3, h) um polinucleotídeo obtido ou obtenível de um fragmento genômico, compreendendo um polinucleotídeo promotor sendo pelo menos 30% idêntico a qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d), e compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma

seqüência de polipeptídeo, que é pelo menos 80% idêntica à seqüência como descrita por SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7 e que está funcionalmente ligada no polinucleotídeo promotor sendo pelo menos 30% idêntico a qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d), ou i) um polinucleotídeo sendo um fragmento equivalente de qualquer polinucleotídeo de a) a f).

Em outra modalidade, a invenção fornece um método de infra-regulação de genes essenciais para o desenvolvimento e a manutenção de um sítio de alimentação de nematódeo, sincícios, ou célula gigante, pela interrupção da função de promotores da presente invenção usando métodos conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte tais como seqüências de anti-senso ou de RNAi.

A invenção também se refere aos cassetes de expressão e às plantas transgênicas que compreendem os polinucleotídeos promotores 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 promotores 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: Seqüência de região de locus At1g21460 (pWT128) de promotor de A. thaliana (SEQ ID NO:1, bases 830-836 de box TATA estão em negrito).

Figura 2: Seqüência de região de locus At5g53190 de promotor de A. thaliana (SEQ ID NO:2).

Figura 3: Seqüência de região de promotor de Glycine max do

gene correspondendo ao clone 47116125 de cDNA (p-47116125) contido em pAW222qcz (SEQ ID NO:3; bases 513-519 de box TATA estão em negrito).

Figura 4: Seqüência do clone 47116125 de cDNA de Glycine max (SEQ ID NO:4). O códon de iniciação de orf (matriz de leitura aberta) está em negrito das bases 23-25. O códon de terminação de orf (matriz de leitura aberta) está em negrito e itálico das bases 785-787. A orf (matriz de leitura aberta) completa compreende as bases 23-787.

Figura 5: Alinhamento de seqüências das seqüências de aminoácidos de clone 47116125 de cDNA de Glycine max (SEQ ID NO:5), locus At1g21460 de A. thaliana (SEQ ID NO:6), e locus At5g53190 de A. thaliana (SEQ ID NO:7).

Figura 6: Seqüência derivada de genome walking pAW127 (SEQ ID NO:8). O códon de iniciação para a seqüência codificadora de 47116125 está marcado em negrito e está localizado em pb 660-662. Há um códon de terminação a montante de seu códon de iniciação na mesma matriz marcada em negrito e itálico. A seqüência de polinucleotídeo promotor clonada em pAW222qcz é representada por nucleotídeos da posição 51 a 659.

Figuras 7a-b: Alinhamento de seqüências de clone 47116125 de cDNA de G. max (SEQ ID NO:4) e seqüência de G. max derivada de genome walking contida em pAW127 (SEQ ID NO:8) selecionando o clone 47116125 de cDNA. O códon de iniciação ATG de clone 47116125 de cDNA de G. max (SEQ ID NO:4) inicia na posição de nucleotídeo 660 da seqüência de pAW127. Um polinucleotídeo promotor de 609 pb é descrito por SEQ ID NO:3 e é derivado da posição de nucleotídeo 51 a 659 da seqüência de pAW127 (SEQ ID NO:8).

Figura 8: Padrões de expressão de β-glicuronidase de vetores binários pAW222qcz e pWT128 no ensaio de raiz peluda de feijão-soja mostrado em Exemplo 3. Raízes peludas não-infectadas de controle e raízes peludas infectadas com nematódeo de cisto de feijão-soja foram coradas 12

dias após inoculação de SCN. O seguinte índice de escore foi usado: "-" para sem coloração de GUS, "+" para coloração de GUS fraca, "++" para coloração de GUS forte.

Figura 9: Padrões de expressão de β-glicuronidase de vetores binários pWT128 e dos construtos de deleção de polinucleotídeo promotor RTJ113 e RTJ114 no ensaio de raiz peluda de feijão-soja mostrado em Exemplo 5. Raízes peludas não-infectadas de controle e raízes peludas infectadas com nematódeo de cisto de feijão-soja foram coradas 12 dias após inoculação de SCN. O seguinte índice de escore foi usado: "-" para sem coloração de GUS,"+" para coloração de GUS fraca,"++" para coloração de GUS forte.

Figura 10: Padrões de expressão de β-glicuronidase de vetores binários pAW222qcz e dos construtos de deleção de polinucleotídeo promotor RTJ117 e RTJ118 no ensaio de raiz peluda de feijão-soja mostrado em Exemplo 5. Raízes peludas não-infectadas de controle e raízes peludas infectadas com nematódeo de cisto de feijão-soja foram coradas 12 dias após inoculação de SCN. O seguinte índice de escore foi usado:"-" para sem coloração de GUS,"+" para coloração de GUS fraca,"++" para coloração de GUS forte.

Figura 11: Iniciadores de PCR usados para obter os polinucleotídeos promotores de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, a deleção de 500 pb de promotor de A. thaliana de locus At1g21460 (SEQ ID NO:1), a deleção de 251 pb de promotor de A. thaliana de locus At1g21460 (SEQ ID NO:1), a deleção de 410 pb de promotor p-47116125 de Glycine max (SEQ ID NO:3), e a deleção de 210 pb de promotor p-47116125 de Glycine max (SEQ ID NO:3).

Figura 12: Tabela mostrando fórmulas de seqüência geral (fórmula 1 e fórmula 2) de elementos de seqüência identificados em fragmentos de polinucleotídeo mínimo.

Figura 13: Seqüência geral para fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo da região de locus At1g21460 de promotor de A. thaliana (pWT128) (SEQ ID NO:43) e tabela mostrando 16 elementos de seqüência contidos em SEQ ID NO. 43.

Figura 14: Seqüência geral para fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo de região de locus At5g53190 de promotor de A. thaliana (SEQ ID NO:44) e tabela mostrando 9 elementos de seqüência contidos em SEQ ID NO. 44

Figura 15: Seqüência geral para fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo de região de promotor de Glycine max do gene correspondendo ao clone 47116125 de cDNA (SEQ ID NO:45) a tabela mostrando 7 elementos de seqüência contidos em SEQ ID NO. 45

DESCRIÇÃO DETALHADA DE CONCRETIZAÇÕES 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", 5ª 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 este 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 ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção podem ser fornecidos isolados e/ou purificados 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 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" como aqui usado refere-se a uma seqüência de DNA que, quando ligada em uma seqüência de nucleotídeos de interesse, é capaz de controlar a transcrição da seqüência 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 desenvolventes 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 cotilédone), 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.

De acordo com a invenção, os polinucleotídeos promotores da presente invenção podem ser postos em associação operativa com um segundo polinucleotídeo para expressão específica para raiz e/ou induzível por nematódeo 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 polinucleotídeo 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 polinucleotídeo promotor. Em geral, os ácidos nucleicos que estão em associação operativa são contíguos.

Seqüências de segundo polinucleotídeo incluem, por exemplo,

por exemplo, uma matriz de leitura aberta, uma porção de uma matriz de leitura aberta, um ácido nucleico codificador de uma proteína de fusão, uma seqüência de anti-senso, uma seqüência codificadora de uma seqüência de RNA de fita dupla, um transgene, e semelhantes. Por exemplo, o segundo polinucleotídeo 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 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 (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 proteína, e semelhantes. No caso de o promotor da invenção ser usado em plantas da família Fabaceae para mediar a expressão em nódulos de raiz, o segundo ácido nucleico pode ser um gene afetando características agronômicas de planta tais como fixação de nitrogênio, transporte de nitrogênio, teor de proteína de planta ou teor de proteína de semente e semelhantes.

Preferivelmente, o segundo polinucleotídeo codifica um RNA de fita dupla (dsRNA) ou polinucleotídeo de anti-senso, que é substancialmente idêntico ou homólogo no todo ou em parte a um gene exigido para formação ou manutenção de um sítio de alimentação de nematódeo. O segundo polinucleotídeo pode alternativamente codificar um agente que interrompe 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 codificar um RNA de fita dupla que é substancialmente idêntico a um gene de planta nos sítios de alimentação de raízes de plana que é essencial para a sobrevivência de nematódeos. Como aqui usados, levando-se em consideração a substituição de timina por uracila quando se comparam seqüências de RNA e DNA, os termos "substancialmente idêntico" e "correspondendo a" significam que a seqüência 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 o controle de nematódeo, o segundo polinucleotídeo posto em associação operativa com os promotores da invenção pode codificar uma proteína tóxica para nematódeo. Por exemplo, polinucleotídeos codificadores de toxinas microbianas ou de 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.

Alternativamente, nematódeos podem ser controlados por interrupção ou erradicação dos sítios de alimentação, sincícios ou células gigantes, usando um método de infra-regulação de genes essenciais para o desenvolvimento e a manutenção de um sítio de alimentação de nematódeo, sincícios, ou célula gigante, pela interrupção da função dos promotores da presente invenção usando métodos conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte tais como seqüências de anti-senso ou RNAi.

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 avenae, Heterodera oryzae, Heterodera cajani, Heterodera trifolii, Globodera pallida, G. rostochiensis, ou Globodera tabacum, Meloidogyne incognita, M. arenaria, M. hapla, M. javanica, M. naasi, M. exigua, Ditylenchus dipsaci, Ditylenchus angustus, Radopholus similis, Radopholus citrophilus, Helicotylenchus multicinctus, Pratylen-chus coffeae, Pratylenchus brachyurus, Pratylenchus vulnus, Paratylenchus curvitatus, Paraty-lenchus zeae, Rotylenchulus reniformis, Paratrichodorus anemones, Paratrichodorus minor, Paratrichodorus christiei, Anguina tritici, Bidera avenae, Subanguina radicicola, Hoplolaimus seinhorsti, Hoplolaimus Columbus, Hoplolaimus

galeatus, Tylenchulus semipenetrans, Hemicy-cliophora arenaria, Rhadinaphelenchus cocophilus, Belonolaimus longicaudatus, Trichodorus primitivus, Nacobbus aberrans, Aphelenchoides besseyi, Hemicriconemoides kanayaensis, Tylenchorhynchus claytoni, Xiphinema americanum, Cacopaurus pestis, 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 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 Naccobus, Cactodera, Dolichodera, Globodera, Heterodera, Punctodera, Longidorus ou Meloidogyne. Em uma modalidade preferida os nematódeos selecionados pertencem a um ou mais gêneros selecionados do grupo de Naccobus, 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 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,* 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 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. zeae.* 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. zeae 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. acronea, M. arabica, M. arenaria, M. artiellia, M. brevicauda, M. camelliae, M. chitwoodi, M. cofeicola, 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. arenariaox, M. chitwoodi.*

A 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, So-lanum, Juglans, Gossypium, Malus, Vitis, Antirrhinum, Populus, Fragaria, Arabidopsis, Picea, Capsicum, Chenopodium, Dendranthema, Pharbitis, Pinus, Pisum, Oryza, Zea, Triticum, Triti-cale, 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, Ciahorium, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Browaalia, Phaseolus, Avena, 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. Conformememente, em ainda outra modalidade a planta é uma plana 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 Saccarum, 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, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, Malvaceae, Linacea, Euphorbiaceae, Convolvulaceae Rosaceae, Cucurbitaceae, Theaceae, Rubiaceae, Sterculiaceae ou Citrus. Em uma modalidade a planta é uma planta da família Fabaceae, Solanaceae ou Brassicaceae. Coformemente, em uma modalidade a planta é da família Fabaceae, preferivelmente do gênero Glycine, Pisum, Arachis, Cicer, Vicia, Phaseolus, Lupinus, Medicago ou Lens. Espécies preferidas da familia 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. Muito 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, preferivelmente do gênero Arabidopsis, Brassica ou Raphanus. Espécies preferidas da familia 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 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. Uma 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, Jatropa ou Rhizinus e as espécies preferidas são 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.

Os polinucleotídeos promotores de Arabidopsis da invenção (SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2) representam regiões de promotor de homólogos de Arabidopsis do clone 47116125 de cDNA de feijão-soja (SEQ ID NO:4) a seqüência codificadora é anotada como gene Tipo Medicago truncatula Nodulin 3 (tipo MtN3). Os polinucleotídeos promotores de Arabidopsis foram isolados de DNA genômico como revelado em Exemplo 2. O polinucleotídeo promotor tipo MtN3 de feijão-soja desta invenção (SEQ ID NO:3) foi isolado do DNA genômico de feijão-soja com revelado em

Exemplo 1. Como demonstrado em Exemplo 3, quando os polinucleotídeos promotores de Arabidopsis e de feijão-soja da invenção foram postos em associação operativa com um gene repórter GUS, a expressão do gene GUS foi supra-regulada em raízes peludas de feijão-soja infectadas por nematódeos.

A invenção é portanto representada por modalidade em um promotor compreendendo um polinucleotídeo promotor isolado tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, ou SEQ ID NO:3, ou um fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo derivado de um polinucleotídeo promotor isolado tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, ou SEQ ID NO:3 que é capaz de conduzir expressão específica para raiz e/ou induzível por nematódeo de um segundo polinucleotídeo. Os métodos aqui revelados podem ser utilizados para isolar fragmentos de polinucleotídeo promotor mínimos adicionais de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, ou SEQ ID NO:3 que são capazes de mediar expressão específica para raiz e/ou induzível por nematódeo de um segundo polinucleotídeo.

Alternativamente, o promotor da invenção compreende um polinucleotídeo promotor isolado que hibridiza sob condições estringentes com um ácido nucleico tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, ou SEQ ID NO:3, ou um fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo derivado de um polinucleotídeo promotor isolado tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, ou SEQ ID NO:3. Condições de hibridização estringentes como aqui usadas são bem conhecidas, incluindo, por exemplo, NaCl 400 mM, PIPES 400 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. A invenção é adicionalmente representada como modalidade em um polinucleotídeo promotor isolado capaz de conduzir expressão específica para

raiz e/ou induzível por nematódeo de um segundo polinucleotídeo que hibridiza sob condições estringentes com um polinucleotídeo promotor compreendendo nucleotídeos 748 a 998, ou 500 a 998, ou 573 a 922 de uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1; um ácido nucleico que hibridiza sob condições estringentes com um ácido nucleico compreendendo nucleotídeos 1637 a 1986 de uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2; um ácido nucleico que hibridiza sob condições estringentes com um ácido nucleico compreendendo nucleotídeos 400 a 609, ou 260 a 609, ou 200 a 609 de uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3; sendo que o polinucleotídeo promotor é induzido em raízes de uma planta por nematódeos parasitas de planta.

O promotor da invenção adicionalmente compreende um polinucleotídeo promotor isolado capaz de conduzir expressão específica para raiz e/ou induzível por nematódeo de um segundo polinucleotídeo que é pelo menos 50-60%, ou pelo menos 60-70%, ou pelo menos 70-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, ou pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntico ou similar a um ácido nucleico tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO;1, 2, ou 3, ou a um fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo derivado de um ácido nucleico tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2 ou 3. O comprimento da comparação de seqüências 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 seqüência. No caso de as duas seqüências a serem comparadas não terem um comprimento idêntico, o termo "o comprimento total da seqüência" refere-se ao comprimento total da seqüência mais curta.

Em uma modalidade o promotor da invenção compreende um polinucleotídeo promotor isolado capaz de conduzir expressão específica para raiz e/ou induzível por nematódeo de um segundo polinucleotídeo que é pelo

menos 70-80%, 80-85%, 85-90%, 90%, 91%, 92%, 93%,,94%, 95%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntico ou é idêntico a um ácido nucleico tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO; 43, 44 ou 45. Em outra modalidade o polinucleotídeo promotor isolado sendo similar a uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO; 43, 44 ou 45 é 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 nucleotídeos mais curto do que seqüência como mostrada em SEQ ID NO: 43, 44 ou 45.

Em outra modalidade o polinucleotídeo promotor isolado é pelo menos 70-80%, 80-85%, 85-90%, 90%, 91%, 92%, 93%,,94%, 95%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntico ou é idêntico a um ácido nucleico tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO; 43, e é mais curto do que SEQ ID NO: 43 em 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 nucleotídeos, ou é não mais curto do que SEQ ID NO: 43. Preferivelmente o polinucleotídeo promotor isolado contém pelo menos 10, 11, 12, 13, 14, ou todos elementos como descritos em Figura 13 e está posicionado na mesma fita e polinucleotídeo (fita - ou +) como descrito na tabela de Figura 13. Preferivelmente os elementos em Figura 13 têm uma seqüência como descrita por SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 ou 42 de acordo com Figura 12, mais preferivelmente têm uma seqüência como descrita por SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 ou 42 de acordo com Figura 12.

Em outra modalidade o polinucleotídeo promotor isolado é pelo menos 70-80%, 80-85%, 85-90%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntico ou é idêntico a um ácido nucleico tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO; 44, e é mais curto do que SEQ ID NO: 44 em 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 nucleotídeos ou é não mais curto do que SEQ ID NO: 44. Preferivelmente o polinucleotídeo promotor isolado contém pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou todos elementos como descritos em Figura 14 está posicionado na mesma fita e

polinucleotídeo (fita - ou +) como descrito na tabela de Figura 14. Preferivelmente os elementos em Figura 14 têm uma seqüência como descrita por SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 41 ou 42, de acordo com Figura 12, mais preferivelmente têm uma seqüência como descrita por SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 39, 41 ou 42 de acordo com Figura 12.

Em outra modalidade o polinucleotídeo promotor isolado é pelo menos 70-80%, 80-85%, 85-90%, 90%, 91%, 92%, 93%,,94%, 95%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntico ou é idêntico a um ácido nucleico tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO; 45, e é mais curto do que SEQ ID NO: 45 em 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 nucleotídeos ou é não mais curto do que SEQ ID NO: 45. Preferivelmente o polinucleotídeo promotor isolado contém pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou todos elementos como descritos em Figura 15 está posicionado na mesma fita e polinucleotídeo (fita - ou +) como descrito na tabela de Figura 15. Preferivelmente os elementos em Figura 15 têm uma seqüência como descrita por SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 31, 34, 35, 36, 37, 38 ou 40, de acordo com Figura 12, mais preferivelmente têm uma seqüência como descrita por SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38 ou 40 de acordo com Figura 12.

O termo "identidade de seqüência" ou "identidade" no contexto de duas seqüências de ácido nucleico ou polipeptídeo faz referência àquelas posições nas duas seqüências onde pares idênticos de símbolos caem juntos quando as seqüências são alinhadas para correspondência máxima sobre uma janela de comparação especificada, por exemplo, quer a seqüência inteira como em um alinhamento global quer a região de similaridade em um alinhamento local. Quando percentagem de identidade de seqüência é usada em referência às proteínas é reconhecido que as posições de resíduos que não são idênticas freqüentemente diferem por substituições de aminoácido conservativas, onde resíduos de aminoácido substituem outros resíduos de

aminoácido com propriedades químicas similares (e.g., carga ou hidrofobicidade) e portanto não muda as propriedades funcionais da molécula. Quando seqüências diferem em substituições conservativas, a identidade de seqüência percentual pode ser ajustada para cima para corrigir a natureza conservativa da substituição. Seqüências que diferem em tais substituições conservativas são ditas em ter "similaridade de seqüência" 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 seqüência.

Como aqui usado, "percentagem de identidade de seqüência" ou "identidade de seqüência percentual" denota um valor determinado primeiro pela anotação em duas seqüências 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 seqüências, denotou uma combinação, ou se não, denotou uma má combinação. Visto que dito alinhamento é construído por otimização do número de bases combinando, ao mesmo tempo que concorrentemente permite que tanto as más combinações em qualquer 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 multiplica o resultado por 100 para dar a percentagem de identidade de seqüência. "Percentagem de similaridade de seqüência" para seqüências 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 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 seqüências para comparação são bem conhecidos na arte. A determinação de identidade percentual ou similaridade percentual (para proteínas) entre duas seqüências 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-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 matemáticos podem ser utilizadas para comparação de seqüência para determinar identidade de seqüência ou para identificar homólogos.

A invenção adicionalmente representa modalidades como "variantes" ou "derivados" dos polinucleotídeos promotores da invenção. Derivados das seqüências de polinucleotídeo promotor específicas e seus elementos específicos podem incluir, mas não são limitados a, deleções de seqüência, mutações pontuais únicas ou múltiplas, alterações em um sítio de enzima de restrição particular, adição de elementos funcionais, ou outros meios de modificação. Esta modificação pode ou não intensificar, ou diferentemente alterar a atividade de regulação de transcrição do dito polinucleotídeo promotor.

Por exemplo, uma pessoa experiente na arte pode delimitar os elementos funcionais e.g. elementos de promotor tais como, mas não

limitados a, sítios de ligação de fator de transcrição dentro das seqüências e deletar quaisquer elementos funcionais não-essenciais. Elementos funcionais podem ser modificados ou combinados para aumentar a utilidade ou aumentar o nível de expressão dos polinucleotídeos promotores da invenção para qualquer aplicação particular.

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 específica para raiz e/ou induzível por nematódeo de um segundo polinucleotídeo. Fragmentos funcionalmente equivalentes de um polinucleotídeo promotor da invenção também podem ser obtidos pela remoção e.g. por deleção de elementos funcionais não-essenciais sem deleção dos essenciais, e.g. sítios de ligação de fator de transcrição. Diminuição da seqüência 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 freqüentemente demonstram agrupamentos de certos elementos promotores conhecidos. Tal análise pode ser realizada usando 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 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 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 748 a 998, ou 500 a 998, ou 573 a 922 de uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1637 a 1986 de uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2, e um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 400 a 609, ou 260 a 609, ou 200 a 609 de uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3, 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 uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3.

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 um fragmento diferente do polinucleotídeo promotor. Estes construtos são então selecionados para atividade. Um meio adequado para seleção para atividade é ligar um 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 mutagenizar 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 seqüência 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 seqüência de polinucleotídeo ou de polipeptídeo possuindo um grau alto de parentesco de seqüência com uma seqüência de referência. Tal parentesco pode ser quantificado pela determinação do grau de identidade e/ou similaridade entre as duas seqüências 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 do 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 seqüência dentre

ortólogos são o resultado de especiação.

Uma das modalidades inclui variantes alélicas de um polinucleotídeo capaz de mediar expressão preferida em raiz e/ou induzível por patógeno selecionado do grupo consistindo de a) um polinucleotídeo tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3; b) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 748 a 998, ou nucleotídeos 500 a 998, ou nucleotídeos 573 a 922 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1; c) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1637 a 1986 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2; d) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 400 a 609, ou nucleotídeos 260 a 609, ou nucleotídeos 200 a 609 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3; e) um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência com qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d); f) um polinucleotídeo hibridizando sob condições estringentes com qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d); e g) 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 uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3. Como aqui usado, o termo "variante alélica" também se refere a um polinucleotídeo contendo polimorfismos que causam mudanças nos nucleotídeos do polinucleotídeo e que existe dentro de uma população natural (e.g. uma variante ou espécie de planta). Tais variações alélicas naturais 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 seqüenciamento 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 que são o resultado de variação alélica natural e não alteram a atividade funcional do polinucleotídeo, e qualquer e todos tais polimorfismos de aminoácido ou variações de uma proteína que são o resultado de variação alélica natural e não alteram a atividade funcional da proteína, são intencionadas para estarem dentro do escopo da invenção. Variantes alélicas ou ortólogos de um gene podem ser usadas para clonar variantes dos polinucleotídeos promotores da invenção.

De maneira conforme em uma modalidade o polinucleotídeo promotor da invenção é obtenível de um fragmento genômico compreendendo um polinucleotídeo promotor sendo pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntico à seqüência como descrita por SEQ ID NO:1, 2, ou 3; ou um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 748 a 998, ou nucleotídeos 500 a 998, ou nucleotídeos 573 a 922 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1; ou um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1637 a 1986 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2; ou um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 400 a 609, ou nucleotídeos 260 a 609, ou nucleotídeos 200 a 609 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3, que está funcionalmente ligado em um polinucleotídeo codificador de uma seqüência de polipeptídeo, que é pelo menos 80% a 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idêntica ou é 100% idêntica à seqüência como descrita por SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7. Em uma modalidade preferida, o fragmento genômico é um fragmento de uma planta. Uma tal planta pode ser qualquer planta, por exemplo mas não limitada a uma planta monocotiledônea ou uma planta dicotiledônea, preferivelmente é de uma planta dicotiledônea, mais preferivelmente é de uma planta pertencendo à família Brassicacea ou Fabacea. Em uma modalidade

ainda mais preferida é de uma planta pertencendo ao gênero Arabidopsis ou Glycine, muito mais preferivelmente de Arabidopsis thaliana ou Glycine max. De maneira conforme, o polinucleotídeo promotor do fragmento genômico media expressão específica para raiz e/ou induzível por nematódeo da seqüência de polipeptídeo, que é pelo menos 80% a 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idêntica ou é 100% idêntica à seqüência como descrita por SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7. Preferivelmente a seqüência de polipeptídeo, que é pelo menos 80% a 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idêntica ou é 100% idêntica à seqüência como descrita por SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7 é induzida em raízes de uma planta exposta a um estímulo de nematódeo. Preferivelmente a distância entre o polinucleotídeo promotor e o polinucleotídeo funcionalmente ligado codificador de uma seqüência de polipeptídeo, que é pelo menos 80% a 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idêntica ou é 100% idêntica à seqüência como descrita por SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7 é não maior do que 3000 pb, 2000 pb, 1000 pb, mais preferivelmente não maior do que 900bp, 800 pb, 700 pb, 600 pb e ainda mais preferivelmente não maior 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb, 100 pb, 50 pb ou 0 pb.

Em outra modalidade, o polinucleotídeo promotor da invenção 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.

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. No caso de plantas da família Fabaceae também pode ser referir à expressão em nódulos de raiz. Em outra modalidade, o promotor é induzido em nódulos de raiz de uma planta Fabaceae, e.g. em nódulos de raiz de Glycine max.

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 um valor nutricional para o nematódeo ou não desenvolvimento de estruturas induzidas pelo nematódeo e.g. 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, ou por medição de tempos de desenvolvimento de nematódeos proporção de nematódeos machos e fêmeas ou o número de ovos de nematódeo produzidos.

A invenção também se apresenta em modalidade como cassetes de expressão compreendendo os polinucleotídeos promotores da invenção. Cassete de expressão" neste contexto é para ser entendido amplamente como compreendendo todas as seqüências 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, 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 seqüência de terminação de transcrição e uma seqüência de poliadenilação. Os vários componentes do cassete de expressão da invenção são seqüencialmente 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 polinucleotídeos consistindo de a) um polinucleotídeo tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3; b) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 748 a 998, ou nucleotídeos 500 a 998, ou nucleotídeos 573 a 922 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1; c) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1637 a 1986 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2; d) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 400 a 609, ou nucleotídeos 260 a 609, ou nucleotídeos 200 a 609 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como

mostrada em SEQ ID NO:3; e) um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência com qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d); f) um polinucleotídeo hibridizando sob condições estringentes com qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d); e g) 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 uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3, h) um polinucleotídeo obtido ou obtenível de um fragmento genômico, compreendendo um polinucleotídeo promotor sendo pelo menos 30% idêntico a qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d), e compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma seqüência de polipeptídeo, que é pelo menos 80% idêntica à seqüência como descrita por SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7. e que está funcionalmente ligada no polinucleotídeo promotor sendo pelo menos 30% idêntico a qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d), ou i) um polinucleotídeo sendo um fragmento equivalente de qualquer polinucleotídeo de a) a f). 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 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 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

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.* yeast; Ma 1988). Seqüências de íntron de planta exemplares incluem íntrons de Adh1, bronze1, actin1, actin2 (WO 00/760067), ou o íntron de sacarose sintase; veja: "The Maize Handbook", Chapter 116, Freeling e Walbot, Eds., Springer, Nova Iorque (1994).

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

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 Inibidor I ou II de protease de batateira ou tomateiro.

Um 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 seqüência de segundo polinucleotídeo é posicionada a jusante

(*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 seqüência 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, 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 seqüência de ácido nucleico de interesse nativa no genoma. Tais inserções 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.

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 para clonagem ou armazenagem de polinucleotídeos ou usadas para transformação de células de planta, tais como, mas não limitadas a, células de *Escherichia coli, Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium 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. 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.

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. O cassete de expressão pode compreender qualquer nucleotídeo promotor da invenção e pode compreender ou pode não compreender um polinucleotídeo promotor como mostrado em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, ou SEQ ID NO:3, um fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo de SEQ ID NO:1, um fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo de SEQ ID NO:2, ou um fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo de SEQ ID NO:3. Alternativamente, a planta transgênica da invenção compreende um polinucleotídeo promotor capaz de mediar expressão preferida em raiz e/ou induzível por nematódeo que hibridiza sob condições estringentes com um polinucleotídeo promotor tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, um fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo de SEQ ID NO:1, um fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo de SEQ ID NO:2, ou um fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo de SEQ ID NO:3. Ademais, a planta transgênica da invenção compreende um polinucleotídeo promotor capaz de mediar expressão preferida em raiz e/ou induzível por nematódeo tendo pelo menos 70% identidade de seqüência com um polinucleotídeo tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, um fragmento de promotor mínimo de SEQ ID NO:1, um fragmento de promotor mínimo de SEQ ID NO:2, ou um fragmento de promotor mínimo de SEQ ID

NO:3.

As plantas transgênicas da invenção são preparadas usando 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 tais 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.

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. O termo "sementes colhidas" refere-se às sementes, que são removidas da planta produtora das sementes, enquanto que o termo "sementes não-colhidas" refere-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. Em outra modalidade a planta é de um gênero selecionado do grupo consistindo de árvores cítricas, ananás, 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 e Arabidopsis thaliana. Em outra modalidade a planta é de um gênero selecionado do grupo consistindo de, tabaco, girassol, ervilha, alfafa, feijão-soja, tomateiro, batateira, algodoeiro, tabaco, berinjela, pimenteira, colza, canola, beterraba, repolho, couve-flor, brócolis, alface, Lotus sp., Medicago truncatula e Arabidopsis thaliana. Em outra modalidade a planta é de um gênero selecionado do grupo consistindo de árvores cítricas, ananás, 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 e Arabidopsis thaliana. Em outra modalidade a planta é de um gênero selecionado do grupo consistindo de, tabaco, girassol, ervilha, alfafa, feijão-soja, tomateiro, batateira, algodoeiro, tabaco, berinjela, pimenteira, colza, canola, beterraba, repolho, couve-flor, brócolis, alface, Lotus sp.,

Medicago truncatula e Arabidopsis thaliana. Em outra modalidade a planta é de um gênero selecionado do grupo consistindo de milho, trigo, cevada, sorgo, centeio, triticale, arroz, cana-de-açúcar, ananás, coqueiro, bananeira, gramínea perene e raigrás.

As plantas transgênicas da invenção podem ser cruzadas com plantas transgênicas similares ou com plantas transgênicas faltantes dos polinucleotídeos promotores da invenção ou do polinucleotídeo promotor da invenção e do segundo polinucleotídeo 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 de interesse 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 os polinucleotídeos promotores 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 genes para dentro do núcleo de célula por transformação de planta. Múltiplos genes podem ser introduzidos no núcleo da célula durante transformação quer seqüencialmente quer simultaneamente.

Múltiplos genes em planta ou espécie de patógeno alvo podem ser infra-regulados por mecanismos de silenciamento de gene, especialmente RNAi, pelo uso de um transgene único selecionador de múltiplas seqüências 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 seqüências de ácido nucleico da presente invenção podem ser empilhadas com qualquer combinação de seqüências 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 seqüências de polinucleotídeo de interesse podem ser seqüencial ou simultaneamente combinadas em qualquer ordem. Por exemplo se dois genes são para serem introduzidos, as duas seqüências podem estar contidas em cassetes de transformação separados ou no mesmo cassete de transformação. A expressão das seqüências 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.

O promotor da presente invenção compreende um ácido nucleico isolado selecionado do grupo consistindo de: a) um polinucleotídeo tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3; b) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 748 a 998, ou nucleotídeos 500 a 998, ou nucleotídeos 573 a 922 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1; c) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 651 a 1000 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2; d) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 400 a 609, ou nucleotídeos 260 a 609, ou nucleotídeos 200 a 609 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3; e)um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência com

qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d); f) um polinucleotídeo hibridizando sob condições estringentes com qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d); g) um polinucleotídeo compreendendo uma porção biologicamente ativa de qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d); e g) 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 uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3 sendo que o promotor é capaz de mediar expressão específica para raiz e/ou induzível por nematódeo. Em uma outra modalidade, dito ácido nucleico compreende nucleotídeos 748 a 998, ou nucleotídeos 500 a 998, ou nucleotídeos 573 a 922 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO: 1. Em uma outra modalidade, dito ácido nucleico tem pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 748 a 998 de SEQ ID NO:1, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 500 a 998 de SEQ ID NO:1, e um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 573 a 922 de SEQ ID NO:1. Em uma outra modalidade, o dito ácido nucleico compreende nucleotídeos 651 a 1000 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2. Em uma outra modalidade, o dito ácido nucleico tem pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2 e um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 651 a 1000 de SEQ ID NO:2. Em uma outra modalidade, o dito ácido nucleico compreende nucleotídeos 400 a 609, ou nucleotídeos 260 a 609, ou nucleotídeos 200 a 609 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3. Em uma outra modalidade, o dito ácido nucleico tem pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo

selecionado do grupo consistindo de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 400 a 609 de SEQ ID NO:3, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 260 a 609 de SEQ ID NO:3, e um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 200 a 609 de SEQ ID NO:3.

Ademais, a invenção refere-se a um cassete de expressão compreendendo o promotor da invenção, que adicionalmente compreende um ou mais polinucleotídeos operacionalmente ligados. Em uma outra modalidade dito cassete de expressão é um cassete de expressão, no qual dito polinucleotídeo operacionalmente ligado codifica um agente que interrompe o metabolismo, o crescimento, e/ou a reprodução de um nematódeo parasita de planta, que confere ou aperfeiçoa a resistência da planta a um nematódeo parasita de planta, ou que é tóxico para um nematódeo parasita de planta.

Ademais, a invenção refere-se a uma planta transgênica transformada com um cassete de expressão, sendo que o cassete de expressão compreende um ácido nucleico isolado selecionado do grupo consistindo de: a) um polinucleotídeo tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3; b) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 748 a 998, ou nucleotídeos 500 a 998, ou nucleotídeos 573 a 922 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1; c) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 651 a 1000 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2; d) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 400 a 609, ou nucleotídeos 260 a 609, ou nucleotídeos 200 a 609 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3; e) um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência com qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d); f) um polinucleotídeo hibridizando sob condições estringentes com qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d); g) um polinucleotídeo compreendendo uma porção biologicamente ativa de qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d); e

h) 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 uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3. Em uma outra modalidade dita planta transgênica compreende um cassete de expressão compreendendo um ou mais polinucleotídeos operacionalmente ligados no ácido nucleico. Em uma outra modalidade dita planta transgênica é selecionada 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, prerennial grass, ryegrass, and Arabidopsis thaliana. Em uma outra modalidade dita planta transgênica é transformada com um cassete de expressão, sendo que o cassete de expressão compreende nucleotídeos 748 a 998, ou nucleotídeos 500 a 998, ou nucleotídeos 573 a 922 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1. Em uma outra modalidade dita planta transgênica é transformada com um cassete de expressão, sendo que o cassete de expressão compreende um ácido nucleico tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 748 a 998 de SEQ ID NO:1, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 500 a 998 de SEQ ID NO:1, e um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 573 a 922 de SEQ ID NO:1. Em uma outra modalidade dita planta transgênica é transformada com um cassete de expressão, sendo que o cassete de expressão compreende um ácido nucleico compreendendo nucleotídeos 651 a 1000 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2. Em uma outra modalidade dita

planta transgênica é transformada com um cassete de expressão, sendo que o cassete de expressão compreende um ácido nucleico tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2 e um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 651 a 1000 de SEQ ID NO:2. Em uma outra modalidade dita planta transgênica é transformada com um cassete de expressão, sendo que o cassete de expressão compreende um ácido nucleico compreendendo nucleotídeos 400 a 609, ou nucleotídeos 260 a 609, ou nucleotídeos 200 a 609 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3. Em uma outra modalidade dita planta transgênica é transformada com um cassete de expressão, sendo que o cassete de expressão compreende um ácido nucleico tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 400 a 609 de SEQ ID NO:3, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 260 a 609 de SEQ ID NO:3, e um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 200 a 609 de SEQ ID NO:3.

Ademais a invenção refere-se a um método para conferir ou aperfeiçoar resistência a nematódeo em uma planta, compreendendo a) preparar um construto compreendendo o promotor de reivindicação 1 operacionalmente ligado em um ou mais polinucleotídeos, b) transformar a célula de planta com o construto de a) sendo que o promotor induz transcrição do polinucleotídeo operacionalmente ligado na célula de planta em resposta a um estímulo de nematódeo; e c) regenerar a célula de planta transformada para produzir uma planta transgênica tendo resistência a nematódeo ou resistência a nematódeo aperfeiçoada. Em uma outra modalidade dito método é um método, no qual o ácido nucleico operacionalmente ligado codifica um agente que interrompe o metabolismo, o crescimento, e/ou a reprodução de

um nematódeo parasita de planta, que confere ou aperfeiçoa resistência da planta a um nematódeo parasita de planta, ou que é tóxico para um nematódeo parasita de planta. Em uma outra modalidade dito método é um método, no qual o promotor é um promotor preferido em raiz e/ou induzível por nematódeo.

Ademais a invenção refere-se a um método para conferir ou aperfeiçoar resistência a nematódeo em uma planta, compreendendo a) preparar um construto compreendendo um primeiro ácido nucleico que está em complementação de anti-senso a uma segunda seqüência de ácido nucleico de reivindicação 1, b) transformar a célula de planta com o construto de a) sendo que a primeira seqüência de ácido nucleico interrompe ou infra-regula a função regulatória da segunda seqüência de ácido nucleico; e c) regenerar a célula de planta transformada para produzir uma planta transgênica tendo resistência a nematódeo ou resistência a nematódeo aperfeiçoada. Em uma outra modalidade dito método é um método, no qual o promotor é um promotor preferido em raiz ou induzível por nematódeo.

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.

EXEMPLOS

Exemplo 1 Clonagem de promotor de gene tipo MtN3 de feijão-soja

Excisão a laser de sincícios

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. Tabela 1 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 (± desvio padrão). Como demonstrado em Tabela 1, clone 47116125 de cDNA de feijão-soja foi identificado como estando supra-regulado em sincícios de raízes de feijão-soja infectadas com SCN.

Tabela 1. Expressão de gene Tipo Medicago truncatula Nodulin 3 (tipo MtN3)

Nome do Gene	Sincícios #1 (N)	Sincícios #2(N)	Não-Sincícios	Raízes de Controle
47116125	3104±477 (4)	2117±450(5)	99±62	191±90

(N) Número de medições de microarranjo de cDNA

Como demonstrado em Tabela 1, Clone 47116125 de cDNA de feijão-soja foi identificado como estando supra-regulado em sincícios de raízes de feijão-soja infectadas com SCN. Figura 4 mostra a seqüência de clone 47116125 de cDNA de feijão-soja. A seqüência de 47116125 cDNA (SEQ ID NO:4) determinada contém a seqüência de matriz de leitura aberta inteira baseada em homologia de aminoácido com as seqüências de aminoácidos de Arabidopsis de identificadores de locus At1g21460 e

At5g53190 como mostrado em Figura 5. A matriz de leitura aberta da seqüência de 47116125 cDNA (SEQ ID NO:4) de bases 23 a 787 como mostrada em Figura 4 foi traduzida e é representada pela SEQ ID NO:5 e a seqüência marcada 47116125 em Figura 5.

Para clonar a seqüência de promotor de 47116125, o Universal Genome Walking Kit (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, Calif.) foi usado de acordo com as instruções do fabricante. Para isto, DNA genômico de feijão-soja (Glycine max, Resnik) foi extraído usando o e Qiagen DNAeasy Plant Minikit (Qiagen). O procedimento consistiu de duas amplificações por PCR, usando um iniciador adaptador e um iniciador específico para gene para reação de amplificação. As seqüências de iniciadores usadas para isolar os promotores da invenção são mostradas em Figura 11. Os iniciadores específicos para gene que selecionam 47116125 (SEQ ID NO:4) foram iniciador primário, 47116125GW (SEQ ID NO: 15) e iniciador aninhado, 47116125GWnest (SEQ ID NO: 16). Os iniciadores adaptadores usados foram AP1 (SEQ ID NO:13) e AP2 (SEQ ID NO:14). Usando este protocolo, vários clones foram isolados e seqüenciados.

O produto clonado mais longo foi identificado como pAW127 (SEQ ID NO:8). Um alinhamento de seqüências de pAW127 com seqüência 47116125 cDNA (SEQ ID NO:4) indicou que este clone é quase idêntico ao 47116125 como mostrado em Figura 7. As más combinações de seqüência entre a seqüência pAW127 e a seqüência 47116125 cDNA são marcadas com um asterisco em Figura 7. O alinhamento revelou que pAW127 continha uma seqüência de promotor de 609 pb a montante do códon ATG do nucleotídeo 51 ao 659 da seqüência pAW127 (veja Figura 7). Este alinhamento também revelou um códon de terminação começando em pb 627 a montante do códon de iniciação ATG na mesma matriz, indicando que o códon de iniciação começando em pb 660 é o primeiro códon de iniciação da matriz de leitura aberta da seqüência de gene 47116125. Esta região de promotor foi clonada

de pAW127 usando técnicas de PCR padrão e os iniciadores 47116125prF (SEQ ID NO:17) e 47116125prR (SEQ ID NO:18). 47116125prF e 47116125prR amplificaram o fragmento de promotor de 609 pb do pAW127 contendo os sítios de restrição de enzima PstI e AscI respectivamente para facilidade de clonagem direcional. O promotor 47116125 e as seqüências 5'UTR, sem os sítios de restrição usados para clonagem, são mostrados como SEQ ID NO:3. seqüência de nucleotídeos 1-609 representa a seqüência de promotor inteira com a região de promotor de núcleo abarcando os nucleotídeos 260-609. O sinal TASTA putativo abarca os nucleotídeos 513 a 519 e a seqüência líder 5' não-traduzida do mRNA dos nucleotídeos 553-609.

Exemplo 2 Clonagem de polinucleotídeos de promotor de gene tipo MtN3 de Arabidopsis

As regiões de polinucleotídeo promotor de genes At1g21460 e At5g53190 de Arabidopsis foram selecionadas baseando-se na similaridade de suas seqüências de aminoácidos codificadas (SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:7, respectivamente) com a seqüência de aminoácidos de clone 47116125 de cDNA de feijão-soja (SEQ ID N0:5) como mostrado em Figura 5. DNA genômico de Arabidopsis (ecotipo Columbia) foi extraído usando o Qiagen DNAeasy Plant Minikit (Qiagen, Valencia, California, US). As regiões de DNA genômico de 998 pb (SEQ ID NO:1) e 1.986 pb (SEQ ID NO:2) (polinucleotídeos promotores) diretamente a montante do códon ATG incluindo região 5'-não-traduzida correspondendo aos genes tipo MtN3 de Arabidopsis com idendificadores de locus, At1g21460 e At5g53190, respectivamente, foram clonadas usando os protocolos de amplificação por PCR padrão. Os iniciadores usados para amplificações por PCR do polinucleotídeo promotor de Arabidopsis são mostrados em Figura 11 e foram designados baseado no banco de dados de seqüências genômicas de Arabidopsis (TAIR). As seqüências de iniciador descritas por SEQ ID NO:9 contêm o sítio de restrição PstI para facilidade de clonagem. A seqüência de

iniciador descrita por SEQ ID NO:11 contém o sítio de restrição PacI para facilidade de clonagem. As seqüências de iniciador descritas por SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 12 contêm o sítio AscI para facilidade de clonagem. Seqüências de iniciador descritas por SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10 foram usadas para amplificar o polinucleotídeo promotor de locus At1g21460 de Arabidopsis descrito por SEQ ID NO:1. Seqüências de iniciador descritas por SEQ ID NO:11 e SEQ ID NO:12 foram usadas para amplificar o polinucleotídeo promotor de locus At5g53190 de Arabidopsis descrito por SEQ ID NO:2, respectivamente.

O tamanho do fragmento de DNA amplificado para cada produto de PCR foi verificado por eletroforese em gel de agarose padrão e o DNA extraído. Fragmentos purificados foram clonados em pCR2.1 usando o kit de clonagem TOPO TA seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen) e seqüenciados usando um seqüenciador automático Applied Biosystem 373A (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, US). Os fragmentos de DNA de 998 pb e 1.986 pb correspondendo aos polinucleotídeos promotores de At1g21460 e At5g53190 são mostrados como SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2. Os sítios de restrição introduzidos nos iniciadores para facilitar clonagem não estão incluídos nas seqüências.

Exemplo 3 Construção de vetor binário para transformação e geração de raízes peludas transgênicas

Para avaliar a atividade de expressão do polinucleotídeo promotor clonado, o fragmentos de gene correspondendo aos nucleotídeos 1 a 998 de SEQ ID NO:1, nucleotídeos 1 a 1.986 de SEQ ID NO:2, e nucleotídeos 1 a 609 de SEQ ID NO:3 foram clonados a montante de um gene repórter GUS (gene de β-glicuronidase bacteriana ou gene GUS (Jefferson (1987) EMBO J. 6, 3901-3907) para criar os vetores binários pWT128qcz, RCB1022 e pAW222qcz, respectivamente. O marcador selecionável de planta nos vetores binários pWT128qcz e pAW222qcz é uma forma resistente a

herbicida do gene de aceto-hidróxi-ácido-sintase (AHAS) de Arabidopsis thaliana (Sathasivan et al., Plant Phys. 97:1044-50, 1991). ARSENAL (imazapir, BASF Corp, Florham Park, NJ) foi usado como o agente de seleção. O marcador selecionável de planta no vetor binário RCB1022 é uma forma resistente a herbicida do gene de aceto-hidróxi-ácido-sintase (AHAS) de Arabidopsis thaliana dirigido pelo promotor constitutivo de ubiquitina de salsa (Sathasivan et al., Plant Phys. 97:1044-50, 1991; Plesch, G.; Ebneth, M. "Method for the stable expression of nucleic acids in transgenic plants, controlled by a parsley ubiquitin promoter". Pedido de Patente WO 03/102198 A1;2003).

No presente exemplo, vetores binários pWT128, e pAW222qcz foram transformados em cepa K599 de A. rhizogenes K599 por eletroporação. Antes da inoculação de A. rhizogenes, sementes de G. max Williams 82 (suscetível a SCN) foram germinadas, cotilédones foram excisados, e lado adaxial foram feridos 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 e 16 horas / luz do dia. Os cotilédones foram então transferidos para cima de placas MS contendo carbenicilina (para suprimir crescimento de A. rhizogenes) e ARSENAL 1 μM (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 os meios de seleção foram colhidas e transferidas para cima de meios de seleção frescos de mesma composição e incubadas a 25°C no escuro. Duas semanas após colheita das raízes peludas e de sua cultura sobre os meios de seleção, as raízes peludas foram subcultivadas sobre meios MS contendo carbenicilina mas não ARSENAL.

Várias linhagens de raízes peludas transgênicas independentes foram geradas da transformação com pAW280. Aproximadamente três

semanas após subcultivo, as linhagens de raízes peludas transgênicas foram inoculadas com H. glycines race 3 J2. Doze dias após inoculação com 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 foi também corada em solução corante de GUS. As raízes foram então observadas sob um microscópio para detecção de expressão de GUS. Para cada linhagem transgênica, 10 sincícios aleatoriamente selecionados foram observados e foram determinados os escores para intensidade de expressão de GUS. O seguinte índice de escore foi usado: "-" para sem 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 naquela 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 de "-" para sem coloração,"-/+" indica que aproximadamente 25% das linhagens testadas mostraram coloração de GUS vascular em menos do que 25% do tecido de raiz observado, "+" para coloração fraca, "++" para coloração forte. Os resultados para linhagens transformadas com pWT128 e pAW222qcz são apresentados em Figura 8.

O resultado de coloração de GUS indica que para a maioria das linhagens testadas, o fragmento de polinucleotídeo promotor em pWT128 mostrou expressão de GUS intermediária a forte nos sincícios e no tecido vascular de raiz a 12 DAI. Em contraste, expressão de GUS em outras partes de raiz tais como pontas de raiz e córtex de raiz foi não detectada ou foi muito fraca. Em adição, o resultado de coloração de GUS indica que para a maioria das linhagens testadas, o fragmento de polinucleotídeo promotor em pAW222qcz mostrou expressão forte de GUS nos sincícios e no tecido

vascular de raiz a 12 DAI. Em contraste, expressão de GUS em outras partes de raiz tais como pontas de raiz e córtex de raiz foi não detectada ou foi muito fraca.

Exemplo 4 Clonagem de deleções de polinucleotídeos promotores At1g21460 (SEQ ID NO:1) e p-47116125 (SEQ ID NO:3)

Com o propósito de mais acuradamente definir a região de polinucleotídeo promotor de At1g21460 (SEQ ID NO:1) e p-47116125 (SEQ ID NO:3), fragmentos mais curtos da seqüência a montante foram testados. DNA plasmídeo de pWT128 e pAW222qcz foi extraído de E. coli usando o Qiagen Plasmid miniprep kit (Qiagen). Os fragmentos de deleção de polinucleotídeo promotor de 499 pb e 251 pb de locus At1g21460A de polinucleotídeo promotor de A. thaliana (SEQ ID NO:1) contidos em pWT128 e os fragmentos de deleção de polinucleotídeo promotor de 410 pb e 210 pb de clone p-47116125 de cDNA de Glycine max (SEQ ID NO:3) contidos em pAW222qcz foram amplificados usando protocolo de amplificação por PCR padrão. Para isto, aproximadamente 0,1 μg de DNA plasmídeo pWT128 ou pAW222qcz foram usados como DNA modelo na reação PCR. Os iniciadores usados para a amplificação por PCR dos polinucleotídeos de Arabidopsis são mostrados em Figura 11 e foram projetados baseados na seqüência de polinucleotídeo promotor de locus At1g21460 de polinucleotídeo promotor de A. thaliana (SEQ ID NO:1) contido em pWT128 ou no polinucleotídeo promotor p-47116125 de Glycine max (SEQ ID NO:3) contido em pAW222qcz. As seqüências de iniciador descritas por SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, e SEQ ID NO:23 contêm o sítio de restrição PstI para facilidade de clonagem. A seqüência de iniciador descrita por SEQ ID NO:21 anela na extremidade 3' do polinucleotídeo promotor At1g21460 e sítio AscI em pWT128 de modo que o sítio AscI estará contido no fragmento amplificado para facilidade de clonagem. A seqüência de iniciador descrita por SEQ ID NO:24 anela na

extremidade 3' do polinucleotídeo promotor p-47116125 a montante do sítio AscI em pAW222qcz de tal modo que o sítio AatII estará contido no fragmento amplificado para facilidade de clonagem. Seqüências de iniciador descritas por SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO:21 foram usadas para amplificar a região de deleção de polinucleotídeo promotor de 499 pb de locus At1g21460 de polinucleotídeo promotor de Arabidopsis promoter contido em pWT128. Seqüências de iniciador descritas por SEQ ID NO:20 e SEQ ID NO:21 foram usadas para amplificar a região de deleção de polinucleotídeo promotor de 251 pb de locus At1g21460 de polinucleotídeo promotor de Arabidopsis contido em pWT128. Seqüências de iniciador descritas por SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:24 foram usadas para amplificar a região de deleção de polinucleotídeo promotor de 410 pb de p-47116125 contida em pAW222qcz. Seqüências de iniciador descritas por SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:24 foram usadas para amplificar a região de deleção de polinucleotídeo promotor de 210 pb de p-47116125 contida em pAW222qcz.

O tamanho de fragmento de DNA amplificado para cada produto de PCR foi verificado por eletroforese em gel de agarose padrão e os fragmentos purificados extraídos de DNA foram digeridos com PstI e AscI para as deleções de polinucleotídeo promotor de At1g21460 amplificado de pWT128 e com PstI e AatII para as deleções de polinucleotídeo promotor de p-47116125 amplificado de pAW222qcz seguindo as instruções do fabricante (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, US). Os fragmentos digeridos foram purificados usando o Qiagen PCR purification kit (Qiagen). A região de deleção de polinucleotídeo promotor de 499 pb de polinucleotídeo promotor At1g21460 amplificada usando os iniciadores SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO:21 é representada pelas bases 500 a 998 de SEQ ID NO:1. A região de deleção de polinucleotídeo promotor de 251 pb de polinucleotídeo promotor At1g21460 amplificada usando iniciadores SEQ ID NO:20 e SEQ ID NO:21 é representada pelas bases 748 a 998 de SEQ ID

NO:1. A região de deleção de polinucleotídeo promotor de 410 pb de polinucleotídeo promotor p-47116125 amplificada usando iniciadores SEQ ID NO:22 e SEQ ID NO:24 é representada pelas bases 200 a 609 de SEQ ID NO:3. A região de deleção de polinucleotídeo promotor de 210 pb de p-47116125 polinucleotídeo promotor usando nucleotídeos SEQ ID NO:23 e SEQ ID NO:24 é representada pelas bases 400 a 609 de SEQ ID NO:3. Os sítios de restrição introduzidos nos iniciadores para facilitação de clonagem não estão incluídos nas seqüências indicadas.

Exemplo 5 Construção de vetor binário de deleções de polinucleotídeo promotor At1g21460 e p-47116125 para a transformação e a geração de raízes peludas transgênicas

Para avaliar a atividade de expressão de deleções de polinucleotídeo promotor clonadas derivadas de pWT128 e pAW222qcz, fragmentos de gene correspondendo aos nucleotídeos 500 a 998 de SEQ ID NO:1, 748 a 998 de SEQ ID NO:1, 200 a 609 de SEQ ID NO:3, e 400 a 609 de SEQ ID NO:3 foram clonados a montante de um gene repórter GUS (gene de β-glicuronidase bacteriana ou gene GUS para criar os vetores binários RTJ113, RTJ114, RTJ117, e RTJ118, respectivamente. O marcador de seleção de planta nos vetores binários foi um gene AHAS mutado de A. thaliana (Sathasivan et al., Plant Phys. 97:1044-50, 1991) que conferiu tolerância ao herbicida ARSENAL (imazapir, BASF Corporation, Florham Park, NJ).

No presente exemplo, vetores binários RTJ113, RTJ114, RTJ117, e RTJ118 foram transformados em cepa K599 de A. rhizogenes por eletroporação. Que por sua vez foi usada para criar raízes peludas transgênicas como descrito em Exemplo 3. As raízes peludas transgênicas foram usadas para colorações de GUS para detectar atividade de polinucleotídeo promotor 7como descrito em Exemplo 3.

Para cada linhagem transgênica, 10 sincícios aleatoriamente

selecionados foram observados e determinados seus escores para expressão de GUS em 12 Dias após infecção (DAI). O seguinte índice de escore foi usado: "-" para sem 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 naquela 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 de "-" para sem coloração, "+" para coloração fraca, "++" para coloração forte. Os resultados para linhagens transformadas com pWT128, RTJ113, e RTJ114 são apresentados em Figura 9. Os resultados para linhagens transformadas com pAW222qcz, RTJ117, e RTJ118 são apresentados em Figura 10.

Os fragmentos de polinucleotídeo promotor de 499 e 251 pb do polinucleotídeo promotor At1g21460 contido em RTJ113 e RTJ114, respectivamente, foram ambos capazes de conferir expressão induzida por nematódeo em sincícios, indicando que todos os elementos regulatórios exigidos para resultar em expressão induzida por nematódeo estão contidos no polinucleotídeo promotor de 251 pb contido em RTJ114. Os resultados indicam que há mais expressão em tecido vascular nos fragmentos de polinucleotídeo promotor de 499 e 251 pb do promotor At1g21460 contido em RTJ113 e RTJ114, respectivamente, comparado como a seqüência de promotor pWT128.

Os fragmentos de polinucleotídeo promotor 410 e 210 pb do polinucleotídeo promotor p-47116125 contido em RTJ117 e RTJ118, respectivamente, foram ambos capazes de conferir expressão induzida por nematódeo em sincícios, indicando que todos os elementos regulatórios exigidos para resultar em expressão induzida por nematódeo estão contidos no fragmento de polinucleotídeo promotor de 210 pb contido em RTJ118. Os resultados indicam que há menos expressão em tecido vascular no fragmento

de polinucleotídeo promotor de 210 pb do promotor p-47116125 contido em RTJ114 comparado com a seqüência de promotor pAW222qcz.

Exemplo 6 Análise PLACE de polinucleotídeos promotores

Resultados de análise PLACE (National Institute of Agrobiological Sciences, Ibaraki, Japão) indicam um box TATA localizado em posição de nucleotídeo 830 até posição de nucleotídeo 836 de SEQ ID NO:1 como mostrado em Figura 1. De acordo com informação do *website* TAIR, a região 5' não-traduzida inicia a cerca de posição de nucleotídeo 923. A seqüência descrita por SEQ ID NO:1 termina imediatamente antes do códon de iniciação ATG. A região central potencial do polinucleotídeo promotor descrito em SEQ ID NO:1 é da posição de nucleotídeo 573 até a posição de nucleotídeo 922.

Resultados de análise PLACE indicam nenhum box TATA localizado dentro de cerca de 300 pb da extremidade 3' de SEQ ID NO:2 como mostrado em Figura 2. A região 5' não-traduzida predita é desconhecida. A seqüência descrita por SEQ ID NO:2 termina imediatamente após o códon de iniciação ATG. A região central potencial do polinucleotídeo promotor descrito por SEQ ID NO:2 é da posição de nucleotídeo 986 até a posição de nucleotídeo 1637.

Resultados de PLACE indicam um box TATA localizado na posição de nucleotídeo 513 até a posição de nucleotídeo 519 de SEQ ID NO:3 como mostrado em Figura 3. Em conseqüência, a região 5' não-traduzida inicia a cerca da posição de nucleotídeo 553. A seqüência descrita por SEQ ID NO:3 termina imediatamente antes do códon de iniciação ATG. A região central potencial do polinucleotídeo promotor descrito por SEQ ID NO:3 é da posição de nucleotídeo 260 até a posição de nucleotídeo 609.

Exemplo 7 Construção de vetor binário para gerar construtos de polinucleotídeo promotor de planta inteira com seleção de BAR

Para avaliar a atividade de expressão dos polinucleotídeos

promotores clonados representados pelos nucleotídeos da posição 250 a 998 de SEQ ID NO:1 e nucleotídeos da posição 1 a 609 de SEQ ID NO:3 em nódulos de feijão-soja após infecção com Bradyrhizobium japonicum e inoculação fúngica com Rhizoctonia solani forma specialis (f. sp.) glycines e Fusarium solani f. sp. glycines, polinucleotídeos promotores representados pelos nucleotídeos da posição 250 a 998 de SEQ ID NO:1 e nucleotídeos da posição 1 a 609 de SEQ ID NO:3 foram clonados a montante de um gene repórter GUS (gene de β-glicuronidase bacteriana ou gene GUS) para criar os vetores binários RTJ125 e RTJ129, respectivamente. O marcador de seleção de planta nos vetores binários é um gene BAR (De Block, M. et. al.(1987) EMBO J.6:2513-2518) dirigido pelo promotor constitutivo de gene de nopalina sintase (p-NOS, An G. et al., The Plant Cell 3:225-233, 1990). Vetores binários RTJ125 e RTJ129 foram usados para gerar raízes transgênicas para análise.

Exemplo 8 Sistema de ensaio de planta de feijão-soja enraizada

Este ensaio pode ser encontrado no pedido copendente USSN 60/871.258 depositado aos 21 de Dezembro de 2006, por meio deste incorporado como referência, e pela descrição que segue.

Sementes limpas de feijão-soja do cultivar de feijão-soja foram esterilizadas na superfície e germinadas. As plantas jovens de feijão-soja resultantes tiveram hipocótilos alongados com epicótilos visíveis. Os explantes foram preparados por remoção dos epicótilos e parte dos hipocótilos. O explante continha um ou dois cotilédones, um meristema auxiliar e o hipocótilo. A capa da semente foi removida para facilitar o desenvolvimento de cotilédone. A extremidade cortada do hipocótilo foi o alvo para transformação / infecção. Três dias antes da inoculação, foi iniciada uma cultura líquida noturna da cultura de Agrobacterium desarmada, por exemplo, cepa K599 de A. rhizogenes desarmada contendo o vetor binário. No dia seguinte a cultura foi espalhada sobre uma placa de ágar LB contendo

canamicina como um agente de seleção. As placas foram incubadas a 28°C por dois dias. Uma placa foi preparada para cada 50 explantes a serem inoculados. Os explantes preparados foram imersos nas colônias espessas de A. rhizogenes desarmada preparadas acima de modo que as colônias ficassem visíveis sobre a superfície de extremidade cortada. Os explantes foram então posicionados sobre ágar 1% em placas de Petri para co-cultura sob luz por 6-8 dias. Após transformação e co-cultivo os explantes de feijão-soja foram transferidos para meio indutor de enraizamento com um agente de seleção, por exemplo S-B5-607 para seleção de gene Bar (De Block et al., EMBO J.6:2513-2518, 1987). O meio S-MS-607 compreende: sais 0,2X MS e vitaminas B5, 2% de sacarose, 400 mg/l de Timentina, e 3mg/L de Glufosinato de Amônio em pH 5,8. Explantes foram mantidos em condição igual que a na etapa de co-cultivo. Duas a três semanas após a seleção e a indução de enraizamento, raízes transformadas foram formadas sobre as extremidades cortadas dos explantes. Explantes foram transferidos para o mesmo meio de seleção (meio S-B5-607) para seleção adicional. Raízes transgênicas proliferaram bem dentro de uma semana no meio estavam prontas para serem subcultivadas.

Exemplo 9 Indução de nódulo em sistema de ensaio de planta enraizada e detecção de atividade de polinucleotídeo promotor em nódulos.

Como mostrado em Exemplo 7, os polinucleotídeos promotores da invenção foram postos em associação operativa com o gene promotor GUS para determinar atividade de expressão. A atividade de β-glicuronidase do gene GUS pode ser detectada em plana por meio de um substrato cromogênico tal como ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-glicurônico (x-Gluc) em uma reação de coloração de atividade (Jefferson, supra).

No presente exemplo, vetores binários RTJ125 e RTJ129 foram transformados em cepa A. rhizogenes K599 cepa SHA017 (pSB1)

desarmada por eletroporação. A Agrobacterium transformada foi usada para induzir formação de raiz em feijão-soja usando o protocolo esboçado em Exemplo 8 usando a extremidade cortada do hipocótilo como o alvo para transformação/infecção de Agrobacterium. Explantes enraizados foram removidos dos meios de alongamento e as raízes foram lavadas com água para remover o excesso de meio. Os explantes inteiros foram transferidos para potes de 10 centímetros contendo areia úmida. Os explantes foram irrigados a cada 2 dias com Meio de Nodulação Tamponado (Ehrhardt et al., 1992). Após dois dias em areia úmida, as raízes de explante foram inoculadas com Bradyrhizobium japonicum.

Para isto, uma cultura de 4 ml de Bradyrhizobium japonicum foi iniciada em meio líquido YM e crescida a 28°C com agitação. Meio YM contém por litro: 10 g de Manitol, 0,4 g de extrato de levedo, 1 ml de K_2HPO_4 (estoque 10% p/v), 4 ml de KH_2PO_4 (estoque 10% p/v), 1 ml de NaCl (estoque 10% p/v), e 2 ml de $MgSO_4.7H_2O$ (estoque 10% p/v). O pH foi ajustado para 6,8 e a solução de volume final de 1 litro foi esterilizada em autoclave. Após 7 dias, 600 microlitros da cultura inicial foram transferidos para 40 ml de meio líquido YM fresco. Foram iniciadas múltiplas culturas de 40 ml. As culturas cresceram por 48 horas a 28°C com agitação para uma OD_{600} de aproximadamente 0,2. As culturas de Bradyrhizobium japonicum foram combinadas e diluídas 6 vezes com Meio de Nodulação Tamponado. Cada pote contendo um explante enraizado foi inoculado com aproximadamente 25 ml da cultura de Bradyrhizobium japonicum diluída. Aproximadamente 4 orifícios de cerca de 5 centímetros de profundidade foram criados na areia usando um tarugo de madeira e a cultura de Bradyrhizobium japonicum diluída foi inoculada nos orifícios com uma pipeta. Iniciando no dia após inoculação, os explantes enraizados foram irrigados com Meio de Nodulação Tamponado a cada 2 dias.

Após 2 semanas, os explantes enraizados foram removidos dos

potes de 10 centímetros e as raízes foram lavadas com água para remover a areia. Regiões de raiz contendo nódulos foram dissecadas usando uma lâmina de barbear e posicionadas dentro de soluções de corante de GUS contendo X-Gluc (2mg/l) e então transferidas para 37°C por 16 horas. Alguns nódulos foram fatiados na metade usando uma lâmina de barbear. A solução corante de GUS foi removida e substituída por uma solução contendo partes iguais de glicerol, água, e ácido acético. Os nódulos de raiz foram então observados para coloração de GUS. Foi observado que os polinucleotídeos promotores descritos por pb 250 a 998 de SEQ ID NO:1 contidos em construto RTJ125 induziram a expressão de GUS em nódulos de raiz. Foi observado que o polinucleotídeo promotor descrito por SEQ ID NO:3 contido em RTJ129 induziu expressão de GUS em nódulos de raiz em uma extensão pequena em alguns nódulos observados na base do nódulo.

Exemplo 10 Ensaio de planta enraizada para detecção de atividade de polinucleotídeo promotor em raízes inoculadas com fungos

Como mostrado em Exemplo 7, os polinucleotídeos promotores da invenção foram postos em associação operativa com o gene repórter GUS para determinar atividade de expressão. A atividade de β-glicuronidase do gene GUS pode ser detectada em planta por meio de um substrato cromogênico tal como ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-glicurônico (x-Gluc) em uma reação de coloração de atividade.

No presente exemplo, vetores binários RTJ125 e RTJ129 foram transformados por eletroporação em A. rhizogenes K599 cepa SHA017 (pSB1) desarmada. A Agrobacterium transformada foi usada para induzir formação de raiz em feijão-soja usando o protocolo esboçado em Exemplo 8.

Para estudar a atividade de polinucleotídeo promotor de pb 250 a 998 de SEQ ID NO:1 e pb 1 a 609 de SEQ ID NO:3 após inoculação com quer Rhizoctonia solani f. sp. glycines quer Fusarium solani f. sp. glycines, várias linhagens transgênicas independentes foram geradas da

transformação com construtos RTJ125 e RTJ129, respectivamente. Linhagens de raiz subcultivadas foram inoculadas com Rhizoctonia solani f. sp. glycines ou Fusarium solani f. sp. Glycines pelo posicionamento de uma quantidade pequena de hifas adjacentemente a várias raízes usado pinça. Em 3 dias após inoculação (DAI), as raízes foram removidas das placas de ágar e coradas em solução corante de GUS contendo Gluc (2mg/l) a 37°C por 16 horas. As raízes foram então observadas sob um microscópio para detecção de expressão de GUS.

Para cada linhagem transgênica, raízes foram observadas e a intensidade de expressão de GUS a 3 dias após infecção (DAI) foi anotada. Foi observado que o polinucleotídeo promotor descrito por pb 250 a 998 de SEQ ID NO:1 contido no construto RTJ125 não induziu expressão de GUS em raízes após inoculação com Rhizoctonia solani f. sp. glycines e Fusarium solani f. sp. glycines. Foi observado que o polinucleotídeo promotor descrito por SEQ ID NO:3 contido em construto RTJ129 não induziu expressão de GUS em raízes após inoculação com Rhizoctonia solani f. sp. glycines ou Fusarium solani f. sp. glycines.

Exemplo 11 Ensaio em planta enraizada de transformação com RCB1022 para análise de coloração de GUS

No presente exemplo, vetor binário RCB1022 será transformado por eletroporação na cepa SHA017 de A. rhizogenes desarmada. A Agrobacterium transformada será usada para induzir transformação de raiz TRAP de feijão-soja usando protocolo esboçado pelo Exemplo 8. Linhagens múltiplas de raízes TRAP de feijão-soja foram geradas usando Agrobacterium desarmada transformada com construto RCB1022. As linhagens de raiz TRAP serão inoculadas com J2 descontaminado em superfície de SCN race 3 no nível de 2.000 J2/placa. Em 12 dias após inoculação (DAI), as raízes serão colhidas pela remoção das placas de ágar e cuidadosamente lavadas com mudanças em água e coloridas em solução

corante de GUS contendo X-Gluc (2mg/l) a 37°C por 16 horas. Uma placa de controle não-inoculada de cada linhagem também será colorida em solução corante de GUS. As raízes serão então observadas sob um microscópio para detecção de expressão de GUS.

Para cada linhagem transgênica, 10 sincícios aleatoriamente selecionados serão observados e seu escore determinado para intensidade de expressão de GUS em 12 Dias após infecção (DAI). O seguinte índice de escore será usado: "-" para sem coloração,"+" para coloração fraca,"++" para coloração forte. Uma média arredondada de 10 contagens será usada para determinar o nível de expressão de GUS nos sincícios naquela 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 serão registrados usando o mesmo índice de escore de GUS: "-" para sem coloração,"+" para coloração fraca,"++" para coloração forte.

Exemplo 12 Coloração de GUS de planta inteira

Plantas de feijão-soja transgênicas inteiras são geradas pela transformação de construtos compreendendo o polinucleotídeo promotor representado pelos nucleotídeos da posição 250 a 998 de SEQ ID NO:1, nucleotídeos da posição 500 a 998 de SEQ ID NO:1, nucleotídeos da posição 748 a 998 de SEQ ID NO:1, nucleotídeos da posição 1 a 609, de SEQ ID NO:3, nucleotídeos da posição 200 a 609 de SEQ ID NO:3, nucleotídeos da posição 400 a 609 de SEQ ID NO:3, ou nucleotídeos da posição 1 a 1986 de SEQ ID NO:2 em associação operativa com o gene promotor GUS para caracterizar a expressão de polinucleotídeo promotor em resposta à infecção de nematódeo em raízes e tecidos de planta inteira através do ciclo de vida da planta. Métodos representativos de caracterização de polinucleotídeo promotor em plantas de feijão-soja inteiras incluem, mas não são limitados 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 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 colhidas são cortadas da planta e imediatamente posicionadas dentro de solução corante de GUS contendo X-Gluc (2mg/l), infiltradas a vácuo por 20 minutos, e transferidas para 37°C por 16 horas. 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 específica para raiz e/ou induzível por nematódeo, sendo que o polinucleotídeo promotor é selecionado do grupo de polinucleotídeos consistindo de:

a) um polinucleotídeo tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3;

b) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 748 a 998, ou nucleotídeos 500 a 998, ou nucleotídeos 573 a 922 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO: 1;

c) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1637 a 1986 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2;

d) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 400 a 609, ou nucleotídeos 260 a 609, ou nucleotídeos 200 a 609 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3;

e) um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência com qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d);

f) um polinucleotídeo hibridizando sob condições estringentes com qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d);

g) 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 uma seqüência como mostrada em SEQIDNO:1,2, ou 3,

h) um polinucleotídeo obtido ou obtenível de um fragmento genômico, compreendendo um polinucleotídeo promotor sendo pelo menos 30% idêntico a qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d), e compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma seqüência de polipeptídeo, que é pelo menos 80% idêntica à seqüência como descrita por SEQ ID NO: 5, SEQ ID

NO: 6 ou SEQ ID NO: 7 e que está funcionalmente ligado no polinucleotídeo promotor sendo pelo menos 30% idêntico a qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d),

i) um polinucleotídeo sendo um fragmento equivalente de a qualquer polinucleotídeo de a) a f).

2. Promotor de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado compreende nucleotídeos 748 a 998, ou nucleotídeos 500 a 998, ou nucleotídeos 573 a 922 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1.

3. Promotor de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado tem pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 748 a 998 de SEQ ID NO:1, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 500 a 998 de SEQ ID NO:1, e um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 573 a 922 de SEQ ID NO:1.

4. Promotor de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado compreende nucleotídeos 1637 a 1986 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQIDNO:2.

5. Promotor de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado tem pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2 e um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1637 a 1986 de SEQ ID NO:2.

6. Promotor de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado compreende nucleotídeos

400 a 609, ou nucleotídeos 260 a 609, ou nucleotídeos 200 a 609 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3.

7. Promotor de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado tem pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 400 a 609 de SEQ ID NO:3, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 260 a 609 de SEQ ID NO:3, e um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 200 a 609 de SEQ ID NO:3.

8. Cassete de expressão, caracterizado pelo fato de compreender o polinucleotídeo promotor como definido na reivindicação 1, que adicionalmente compreende um ou mais polinucleotídeos operacionalmente ligados.

9. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que dito polinucleotídeo operacionalmente ligado codifica um agente que interrompe o metabolismo, o crescimento, e/ou a reprodução de um nematódeo parasita de planta, que confere ou aperfeiçoa resistência da planta a um nematódeo parasita de planta, ou que é tóxico para um nematódeo parasita de planta.

10. Planta transgênica, caracterizada pelo fato de estar transformada com um cassete de expressão, sendo que o cassete de expressão compreende um polinucleotídeo promotor, capaz de mediar expressão específica para raiz e/ou induzível por nematódeo, sendo que o polinucleotídeo promotor é selecionado do grupo de polinucleotídeos consistindo de:

a) um polinucleotídeo tendo uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3;

b) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 748 a 998,

ou nucleotídeos 500 a 998, ou nucleotídeos 573 a 922 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1;

c) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1637 a 1986 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2;

d) um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 400 a 609, ou nucleotídeos 260 a 609, ou nucleotídeos 200 a 609 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3;

e) um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de seqüência com qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d);

f) um polinucleotídeo hibridizando sob condições estringentes com qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d);

g) 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 uma seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, 2, ou 3,

h) um polinucleotídeo obtido ou obtenível de um fragmento genômico, compreendendo um polinucleotídeo promotor sendo pelo menos 30% idêntico a qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d), e compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma seqüência de polipeptídeo, que é pelo menos 80% idêntica à seqüência como descrita por SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7. e que está funcionalmente ligada no polinucleotídeo promotor sendo pelo menos 30% idêntico a qualquer um dos polinucleotídeos de a) a d),

i) um polinucleotídeo sendo um fragmento equivalente de qualquer polinucleotídeo de a) a f).

11. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o cassete de expressão adicionalmente

compreende um ou mais polinucleotídeos operacionalmente ligados no polinucleotídeo promotor.

12. Planta de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a planta é selecionada 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, e Arabidopsis thaliana.

13. Planta de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado compreende nucleotídeos 748 a 998, ou nucleotídeos 500 a 998, ou nucleotídeos 573 a 922 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1.

14. Planta de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado tem pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:1, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 748 a 998 de SEQ ID NO:1, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 500 a 998 de SEQ ID NO:1, e um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 573 a 922 de SEQ ID NO:1.

15. Planta de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado compreende nucleotídeos 1637 a 1986 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQIDNO:2.

16. Planta de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado tem pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo selecionado do grupo

consistindo de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:2 e um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 1637 a 1986 de SEQ ID NO:2.

17. Planta de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado compreende nucleotídeos 400 a 609, ou nucleotídeos 260 a 609, ou nucleotídeos 200 a 609 de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3.

18. Planta de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo promotor isolado tem pelo menos 70% de identidade de seqüência com um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de um polinucleotídeo tendo a seqüência como mostrada em SEQ ID NO:3, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 400 a 609 de SEQ ID NO:3, um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 260 a 609 de SEQ ID NO:3, e um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos 200 a 609 de SEQ ID NO:3.

19. Método para conferir ou aperfeiçoar resistência a nematódeo em uma planta, caracterizado pelo fato de que a) preparar um cassete de expressão de acordo com a reivindicação 8, b) transformar uma célula de planta com o cassete de expressão de a) sendo que o polinucleotídeo promotor induz transcrição, em célula de planta, do segundo polinucleotídeo operacionalmente ligado em resposta a um estímulo de nematódeo; 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 sem compreender o cassete de expressão de a).

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o segundo polinucleotídeo operacionalmente ligado codifica um agente que interrompe o metabolismo, o crescimento, e/ou a reprodução de um nematódeo parasita de planta, que confere ou aperfeiçoa resistência da

planta a um nematódeo parasita de planta, ou que é tóxico para um nematódeo parasita de planta.

21. Método para conferir ou aperfeiçoar resistência a nematódeo em uma planta, caracterizado pelo fato de compreender a) preparar um cassete de expressão como definido na reivindicação 8 compreendendo um segundo polinucleotídeo que está em orientação de anti-senso a um polinucleotídeo promotor de acordo com a reivindicação 1, b) transformar a célula de planta com o construto de a) sendo que o segundo polinucleotídeo interrompe ou infra-regula a função regulatória do polinucleotídeo promotor; e 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 sem compreender o cassete de expressão de a).

Figura 1: Seqüência de região de promotor de locus At1g21460 de A. thaliana (pWT128) (SEQ ID NO:1). Um box TATA está localizado em par de bases 830 até o par de bases 836 e está marcado em negrito.

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

Figura 2: Seqüência de região de promotor de locus At5g53190 de A. thaliana (SEQ ID NO:2).

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

Figura 3: Seqüência de região de promotor de Glycine max do gene correspondendo ao clone 47116125 de cDNA contido em pAW222qcz chamado de p-47116125 (SEQ ID NO:3). Um box TATA está localizado no par de bases 513 até o par de bases 519 e está marcado em negrito.

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

Figura 4: Seqüência de clone 47116125 de cDNA de Glycine max. O códon de iniciação está em negrito a partir das bases 23-25. O códon de iniciação de orf (matriz de leitura aberta) está em negrito e em itálico a partir das bases 785-787. A orf (matriz de leitura aberta) completa abarca as bases 23-787.

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

Figura 5: Alinhamento de seqüências das seqüências de aminoácidos do clone 47116125 de cDNA de Glycine max (SEQ ID NO:5), locus At1g21460 de A. thaliana (SEQ ID NO:6), e locus At5g53190 de A. thaliana (SEQ ID NO:7).

```
                    1                                                  50
 47116125     (1)  MAETIRLAVAVLGNAASVALYAAPMVTFRRVIRKKSTEEFSCFPYIIGLL
At1g21460     (1)  -MNIAHTIFGVFGNATALFLFLAPSITFKRIIKNKSTEQFSGIPYPMTLL
At5g53190     (1)  MGDKLRLSIGILGNGASLLLYTAPIVTFSRVFKKKSTEEFSCFPYVMTLF

                    51                                                 100
 47116125    (51)  NCLLFTWYGLPVVSYKWENFPLVTVNGVGIVLELSYVLIYFWYASAKGKV
At1g21460    (50)  NCLLSAWYGLPFVS--KDNTLVSTINGTGAVIETVYVLIFLFYAPKKEKI
At5g53190    (51)  NCLIYTWYGLPIVSHLWENLPLVTINGVGILLESIFIFIYFYYASPKEKI

                    101                                                150
 47116125   (101)  KVAMTAIPVLLVFSIIAAVSAFAFHDNHHRKLLVGSIGLGVSVTMYGSPL
At1g21460    (98)  KIFGIFSCVLAVFATVALVSLFALQGN-GRKLFCGLAATVFSIIMYASPL
At5g53190  (101)  KVGVTFVPVIVGFGLTTAISALVFDDHRHRKSFVGSVGLVASISMYGSPL

                    151                                                200
 47116125   (151)  IVMKKVIQTKSVEFMPLPLSMCSFLATVLWLIYGLLIRDIFVAGPSAVGT
At1g21460  (147)  SIMRLVVKTKSVEFMPFFLSLFVFLCGTSWFVYGLIGRDPFVAIPNGFGC
At5g53190  (151)  VVMKKVIETRSVEYMPFYLSFFSFLASSLWLAYGLLSHDLFLASPNMVAT

                    201                                                250
 47116125   (201)  PLGILQLVLYCKYRKG-----SVVEDPSKGDLEKGNLEKVEMEIGKVEMN
At1g21460  (197)  ALGTLQLILYFIYCGNK---------GEKSADAQKDEKSVEMKDDEKKQN
At5g53190  (201)  PLGILQLILYFKYKNKKDLAPTTMVITKRNDHDDKNKATLEFVVDVDRNS

                    251       263
 47116125   (246)  VTNHMNGHS----
At1g21460  (238)  VVNGKQDLQV---
At5g53190  (251)  DTNEKNSNNASSI
```

Figura 6: Seqüência de seqüência derivada de percurso de genoma pAW127 (SEQ ID NO:8). O códon de iniciação da seqüência codificadora de 47116125 está marcado em negrito e localizado em pb 660-662. Há um códon de terminação a montante deste códon de iniciação na mesma matriz marcada em negrito e itálico começando em pb 627. A seqüência de promotor clonada em pAW222qcz é representada pelas bases pb 51 a 659.

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

Figura 7a:
Alinhamento de seqüências de clone 47116125 de cDNA de G max (SEQ ID NO:4) e seqüência de G max derivada de percurso de genoma em pAW127 (SEQ ID NO:8) selecionando clone 47116125 de cDNA. O códon de iniciação ATG de clone 47116125 de cDNA de G max (SEQ ID NO:4) inicia em pb 660 de seqüência pAW127. Um polinucleotídeo promotor de 609 pb é descrito por SEQ ID NO:3 e é derivado das bases 51 a 659 de seqüência de pAW127 (SEQ ID NO:8). Más combinações de seqüências entre seqüência de pAW127 e seqüência de 47116125 cDNA estão marcadas com um asterisco.

```
pAW127          #1          ACTATAGGGC ACGCGTGGTC GACGGCCCGG GCTGGTATCT CTACAAAATG

pAW127          #51         GAAGCCACGT CATGAAGAGT ATATCATTTC AGTAATGTTT TGAGACGCCT

pAW127          #101        CTATAATGCT TTACCAACAA AACAAAACAA AAAAAAGAAC ATTTGAAACC

pAW127          #151        ATTTGTATTA AAAAAAAAAA GGTATATTAG GCCATAATAT TATAGGTAAC

pAW127          #201        ATGAAATATC AAATGACACG CAAGAGTTTT GTCAAAAATG AAACCATCAC

pAW127          #251        ACATCAGAGA TTATGGCAAA TAATGTTTTG TGTGTCTCTT GCTTCACCCA

pAW127          #301        TAACATAAGC CTCTATAACT GGAGAGAAGA AAAAAAAAAG TGGAGGGGCT

pAW127          #351        AGGGTGGGAA TTTGGAAGAA TACAGTTATA TTGAGCATTG AGCAAGTTGA

pAW127          #401        TAGAAAGCTT CTCAATTTGT ACAAAATTTG CATCCACATG ATTATTAAAG

pAW127          #451        ACGTAGACAG CACTTCTTCC TTCTTTTTTT CTATAAGTTT CTTATATATT

pAW127          #501        GTTCTTCATG TTTTAATATT ATTACTTTAT GTACGCGTCT AACAGTAGTC

pAW127          #551        CTCCCAAACT GCTATAAATA GAGCCTCTTC AACGCACCTC TTGGCAGTAC

47116125        #1                                                  GCA TTCAGTAAAA
pAW127          #601        AAAAATTATT CATCTCTTCT AAGTTCTAAT TTTCTAAGCA TTCAGTAAAA

47116125        #14         GAACTAAACA TGGCAGAGAC CATTCGTTTG GCTGTTGCTG TTCTT:::::
pAW127          #651        GAACTAACCA TGGCAGAGAC CATTCGCTTG GGTGTTGCTG TTCTTGGTAC
                                  *                    *     *

47116125        #64         :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
pAW127          #701        TTCTTCGTTC ATTCATTCCT TAGCTTTGAA CGTATAGGGT GATTAATTAT

47116125        #114        :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
pAW127          #751        TATTCATTAT TTGAGTCTTC AAAAAAAGTG ACTCATTAGT ACCACTGTTT
```

Figura 7b

```
47116125    #164     :::::::::: ::::::::GG CAATGCAGCC TCAGTTGCCC TTTATGCTGC
pAW127      #801     GTTTTTTTTT TTCTTGCAGG CAATGCAGCC TCAGTTGCCC TTTATGCTGC

47116125    #214     ACCAATG::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
pAW127      #851     ACCAATGTAT GTTACATGTT ACATATATAA TAACATTGCT GCCCAAATGT

47116125    #264     :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::
pAW127      #901     CCTCCCCTTT AGAGAATGAA TAAAGTGCTG AACGCTTTTT CATGCTTTTC

47116125    #314     :::::::::: GTTACCTTTA GAAGAGTTAT AAGGAAGAAA AGCACAGAGG
pAW127      #951     ATGTTCCAGG GTTACCTTTA GAAGAGTTAT AAGGAAGAAA AGCACAGAGG

47116125    #364     AGTTTTCATG CTTTCCTTAC ATCATTGGCC TCTTGAATTG TCTCCTTTTC
pAW127      #1001    AGTTTTCATG CTTTCCTTAC ATCATTGGCC TCTTGAACTG TCTCCTTTTC
                                                          *

47116125    #414     ACTTGGTACG GTTTGCCTGT TGTGAGTTAC AAGTGGGAAA ATTTCCCTCT
pAW127      #1051    ACTTGGTACG GTTTGCCTAT TGTTAGCTAC AAGTGGGAAA ATTTCCCTCT
                                       *     *  *

47116125    #464     CGTCACAGTT AATGGAGTTG GTATTGTTCT CGAGTTATCC TATGTTCTCA
pAW127      #1101    CGTCACAGTT AATGGAGTTG GTATTGT

47116125    #514     TTTACTTCTG GTATGCTTCA GCCAAAGGAA AGGTGAAGGT AGCCATGACT

47116125    #564     GCAATACCAG TTTTGCTGGT GTTCTCTATA ATTGCTGCAG TGTCAGCTTT

47116125    #614     TGCATTCCAT GATAATCATC ACCGGAAGCT TCTCGTAGGT AGCATCGGCT

47116125    #664     TAGGTGTTTC AGTAACAATG TATGGATCCC CTTTGATTGT AATGAAGAAA

47116125    #714     GTTATACAAA CCAAGAGTGT GGAATTCATG CCACTACCGT TATCCATGTG

47116125    #764     CTCATTTTTA GCCACTGTTC TCTGGCTGAT TTATGGACTT CTCATTCGTG

47116125    #814     ATATATTCGT TGCGGGTCCT AGTGCGGTTG GAACTCCCTT GGGGATCTTG

47116125    #864     CAACTTGTAC TTTACTGTAA ATACCGAAAA GGGAGTGTTG TGGAGGATCC

47116125    #914     AAGTAAGGGG GACCTTGAGA AGGGTAACTT GGAGAAGGTG GAAATGGAAA

47116125    #964     TTGGGAAAGT GGAAATGAAT GTCACGAATC ACATGAACGG ACACTCGTGA

47116125    #1014    ACAATGCGTC TAAGGGGAAA GATTGAAGAT TACAGAATGT TCTATTCAGA

47116125    #1064    TTCCTTCTTT TTATGTTTTA TTTCCTTTAT TTTAAGACAA AATGATCCCC

47116125    #1114    CCTTAGCTTT GGTTGTATTG CTCACATATA AATTAAGTTA TATTACTTCC

47116125    #1164    CAAAAAAAAA AAAAAAAAA
```

Figura 8: Padrões de expressão de β-glicuronidase de vetores binários pAW222qcz e pWT128 no ensaio de raiz peluda de feijão-soja mostrado em Exemplo 2. Raízes peludas não-infectadas de controle e raízes peludas infectadas com nematódeo de cisto de feijão-soja foram coradas 12 dias após inoculação de SCN. O seguinte índice de escore foi usado:"-" para sem coloração de GUS,"+" para coloração de GUS fraca,"++" para coloração de GUS forte.

Infectado com SCN:

SeqID	Construto	Ponta de raiz	Vascular	Cortical	Sincícios
1	PWT128	-	+	-	+
3	PAW222qcz	-	++	-	++

Controle não infectado:

SeqID	Construto	Ponta de raiz	Vascular	Cortical
1	PWT128	-	+	-
3	pAW222qcz	-	++	-

Figura 9: Padrões de expressão de β-glicuronidase de vetores binários pWT128, RTJ113, e RTJ114 no ensaio de raiz peluda de feijão-soja mostrado em Exemplo 4. Raízes peludas não-infectadas de controle e raízes peludas infectadas com nematódeo de cisto de feijão-soja foram coradas 12 dias após inoculação de SCN. O seguinte índice de escore foi usado:"-" para sem coloração de GUS,"+" para coloração de GUS fraca,"++" para coloração de GUS forte.

Infectado com SCN:

SeqID	Construto	Ponta de raiz	Vascular	Cortical	Sincícios
1	PWT128	-	+	-	+
1	RTJ113	-	++	-	+
1	RTJ114	-	++	-	+

Controle não infectado:

SeqID	Construto	Ponta de raiz	Vascular	Cortical
1	PWT128	-	+	-
1	RTJ113	-	++	-
1	RTJ114	-	++	-

Figura 10: Padrões de expressão de β-glicuronidase de vetores binários pAW222qcz, RTJ117, e RTJ118 no ensaio de raiz peluda de feijão-soja mostrado em Exemplo 4. Raízes peludas não-infectadas de controle e raízes peludas infectadas com nematódeo de cisto de feijão-soja foram coradas 12 dias após inoculação de SCN. O seguinte índice de escore foi usado:"-" para sem coloração de GUS,"+" para coloração de GUS fraca,"++" para coloração de GUS forte.

Infectado com SCN:

SeqID	Construto	Ponta de raiz	Vascular	Cortical	Sincícios
3	PAW222qcz	-	++	-	++
3	RTJ117	-	++	-	++
3	RTJ118	-	+	-	++

Controle não infectado:

SeqID	Construto	Ponta de raiz	Vascular	Cortical
3	PAW222qcz	-	++	-
3	RTJ117	-	++	-
3	RTJ118	-	+	-

Figura 11: Iniciadores de PCR usados para obter os polinucleotídeos promotores de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, a deleção de 500 pb de promotor de A thaliana de locus At1g21460 (SEQ ID NO:1), a deleção de 251 pb de promotor de A. thaliana de locus At1g21460 (SEQ ID NO:1), a deleção de 410 pb de promotor p-47116125 de Glycine max (SEQ ID NO:3), a deleção de 210 pb de promotor p-47116125 de Glycine max (SEQ ID NO:3).

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

Figura 12: Tabela mostrando várias fórmulas de seqüência gerais (fórmula 1 e fórmula 2) de elementos de seqüência identificados em fragmentos de polinucleotídeo promotor mínimos.

Elemento de seqüência	Fórmula geral 1 para elemento de seqüência	SEQ ID NO:	Fórmula geral 2 para elemento de seqüência	SEQ ID NO:
elemento 1	wndwmvnkmdagaan	25	wraaavttwdagaad	34
elemento 2	nnwmwhmwsttannnnn	26	rramwacwsttakmynh	35
elemento 3	wmwactdttdnnh	27	wmwactdttakwh	36
elemento 4	nbnntatawawhnnn	28	hydhtatawatabrs	37
elemento 5	hawhttawtnn	29	waawttawtmh	38
elemento 6	dnwrnnnttaadwdhdn	30	wnwrdtwttaawwdwwv	39
elemento 7	nnaamwnwnndnwnwnrrd	31	kraaatwakrrywtwraak	40
elemento 8	nnnatdattan	32	ymratdattan	41
elemento 9	dwwdwhwaamwbwanwd	33	wattwwtaaawgwayaw	42

Símbolos de letra usados como abreviações para nucleotídeos alternativos

símbolo	Nucleotídeos alternativos
a	a (adenina)
g	g (guanina)
c	c (citosina)
t	t (timina)
r	g ou a
y	t ou c
m	a ou c
k	g ou t
s	g ou c
w	a ou t
b	g ou c ou t
d	a ou g ou t
h	a ou c ou t
v	a ou g ou c
n	a ou g ou c ou t

Figura 13: Seqüência geral para fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo de região de locus At1g21460 de promotor de A. thaliana (pWT128) (SEQ ID NO:43) e tabela mostrando 16 elementos de seqüência contidos em SEQ ID NO. 43.

```
  1  CAAAAATTAA TAACAGANNN NTGTATTTTT AAAATTTAAT ATTTAATACC
 51  ATTATTTCAT AATTTATTAT ACTTTTATTA ATTTTGTAAT TATTGGNNNN
101  NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NTCGATATAT ATACGCNNNN
151  NNNNAGAAAA CACTTAGCTC ANATTCTCTC ACTTTCTNNN
```

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

Figura 14: Seqüência geral para fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo de região de locus At5g53190 de promotor de A. thaliana (SEQ ID NO:44) e tabela mostrando 9 elementos de seqüência contidos em SEQ ID NO. 44

```
  1  ATTCTAAAAT TTCCANNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
 51  NNNNNNNNNN NAAAAACTTA GAGAAGNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
101  NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
151  NNNNNNNNNN NTAGATGATT ATTTTTAAAT GAACATTAAA GAAAAACTAT
201  TATATATATA C
```

Elemento (No.)	Posição inicial (nucleotídeo)	Posição final (nucleotídeo)	Fita mais (+) ou fita menos (-)
elemento 1	1	15	-
elemento 1	62	76	+
elemento 8	162	172	+
elemento 6	168	184	+
elemento 9	170	186	+
elemento 1	180	194	+
elemento 2	191	207	+
elemento 3	193	205	+
elemento 4	197	211	+

Figura 15: Seqüência geral para fragmento de polinucleotídeo promotor mínimo de região de promotor de Glycine max do gene correspondendo ao clone 47116125 de cDNA (SEQ ID NO:45) e tabela mostrando 7 elementos de seqüência contidos em SEQ ID NO. 45

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

Elemento (No.)	Posição inicial (nucleotídeo)	Posição final (nucleotídeo)	Fita mais (+) ou fita menos (-)
elemento 1	1	15	-
elemento 5	38	48	+
elemento 2	58	74	-
elemento 3	60	72	-
elemento 4	82	96	+
elemento 5	125	135	+
elemento 7	139	157	-

RESUMO

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

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

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> BASF Plant Science GmbH
Wiig, Aaron

<120> Elementos Regulatórios e Promotores De Gene tipo MtN3 De Planta Induzíveis Por Nematódeo

<130> 15189

<160> 45

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 998
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1
ctccggttaa aatgatcatg aatgaaccga tatggtttgg gtaaagctga ataagctaac 60

tcgtggtgac tagaaaacat tccaaaaaga tcactcacta tactaaaaag tatatcctgc 120

ggctgtggtt caacggtata gaataactga aatttagtga aacttattgg tgcccttaaa 180

taaacttgac agtttgttag gtttggtttc gcttatgtaa ccagaaactt cctaaactgt 240

caaattttat ctagaatctc tattaaagag ggcaacgaaa aaaaaaaagt aacacatcat 300

ggagaagatg aaccactagc cactgccccg cagaaaatac aggctcgggc ctcgagtcac 360

atatcaacgt caagcccaga acactctggc ttgttcagag ctacttttag tatcaaacaa 420

aaaacaaaag aagaaaagac attgctcttt ttaggtgttt atttcatttt taagtattta 480

accatatctc tataactatc tacaaaagaa acgtcgatcc aaagagtcag gttcacctct 540

cgaggacgta aaaacaagta acagataaaa aacctcgttc caaaaattaa tttggtatca 600

agaaaaaatc tgtatatata cactagaatt caaaatcatg ggaacttttt ttttttatat 660

aagaaataac tcaattaact caaatttaaa acttaggttt tctcaaaaca ttagttctta 720

accataactt ttttttcaaa ttttattcat actacaaaaa ttaataacag aaccatgtat 780

ttttaaaatt taatatttaa taccattatt tcataattta ttatactttt attaattttg 840

taattattgg tgttccacag tgaagcggtt aacacacgct gaatctcgat atatatacgc 900

ttgccgatag aaaacactta gctcatattc tctcactttc tctctcagct tacgaacaag 960

aaaaaaagaa gaatctttag ccacctttga gatcaaaa 998

<210> 2
<211> 1986
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2
cgactgtctc atcatttgtg atttttttttt gccagtactt tatttttttt ggtaaactag 60

attggtctta taacttataa gttataacaa aatcacatcc ctctgtaaat ttatttattt 120

taactttaac caaaaaatca aaagaataag ttgtgctgtg ttgaggacaa attttataat 180

aaagaaataa ggacacgaag gaagaatgga agtccttgct agttggtgcc atttccaata 240

cgattccaac aacttagcca actttttttt ttttttttt ttttgataaa gaacacctta 300

gccaacttac gaaaagtttc taactctttc gttctttatt agttctatat gtattaatgc 360

atgcattatt gtgaccaaaa agtatatatt aaataaaaaa tgtatatttt catgtaattt 420

tgtttgtaat attatttatt ttagttttat aaattcaccg tattctatta gttcgctagg 480

ttcttgaaac tcaaaatttg attcttgagt gatatatggt aatctagcaa ctcgaattag 540

cctgtaaatt aatttagaac aatgtaaaga tttcatgttt ttacgtataa attacatgtt 600

tgcaaattaa ttagtttgga ttttggtata taaatgagga tattttcatt catttaagtg 660

ttttgatgtt gagaaaacat aggtataaat gatgaatata taacaccaac atcataattg 720

ttagtaaata ttcatttgaa aagagtgaga tcagaaattg attgataagg aagagacaat 780

acaaaagaga tggaaaatga actaagtaaa ccataagcat aactggatgt gcatttcaag 840

cataatttgg ctcaaaacta aatttataat taaaatagat aatcctaatt ttttgacaag 900

attttttttt tgttgagaaa atgtttataa tatacaaagt tcttgataaa ggacactagt 960

ttcacacccc acgtgttgct aaccggccac cacaaagcta acttaaaaat gtttttaact 1020

tttttaattg gagttccttt ttatctccat gcattattat cattttctat tatatattcc 1080

ataagcactt aaacaaatca gtcttcttta ttcgattcgg aatttaatgt gatacaaaca 1140

aaataatcaa agtttttgtg tgtatatccg tttaaaaaaa gggagatttg tgtgtacgat 1200

ttggatcaag ccttttttgcg catcaaaatt gtcacttgca gacgttaatg tgcccgttag 1260

accttcacaa tctattaaac taaataattt aaaaaatttc tattactgga tatatatata 1320

tatatatata tataacgtta taatcaggta aaattacttt cgtaaaaaca aaaaacaaaa 1380

aatgatttac aaatttggtt ttgtaagata tatatatata tatatatata tatatgcgtt 1440

tgtaatttgg gatggaatgg ttgctaatag gttgttgaat cacataattt gtgtgatata 1500

tcatctagtg ttatacgtgt atataagttt gtgtaagaca ttgtatatat aaacaactta 1560

atctccacac acgtctaata atgtcatata tatggtctga taactccaag aacttgaaat 1620

tagatttagt aaactcaaga aatgaacaac catctttcta ggttcgtttc tagttaatga 1680

aacatccgtg tatgaaaatt atatgttatt ctaaaatttc cagtagtttt tctaattcaa 1740

gcttggtctc tatgttttag aaaaaaagaa aaacttagag aagcaattgt tatttatctc 1800

atcacaccaa tataattttt ggaaccaaat tgttaaatta ccaaatgtcc caaacttgtg 1860

atcaaattta gatgattatt tttaaatgaa cattaaagaa aaactattat atatatacac 1920

acccattata gacgtaactc tactgcttcc aacttttccc taatctttgt tcttccggcc 1980

aatcaa 1986

<210> 3
<211> 609
<212> DNA
<213> Glycine max

<400> 3
gaagccacgt catgaagagt atatcatttc agtaatgttt tgagacgcct ctataatgct 60

ttaccaacaa aacaaaacaa aaaaaagaac atttgaaacc atttgtatta aaaaaaaaaa 120

ggtatattag gccataatat tataggtaac atgaaatatc aaatgacacg caagagtttt 180

gtcaaaaatg aaaccatcac acatcagaga ttatggcaaa taatgttttg tgtgtctctt 240

gcttcaccca taacataagc ctctataact ggagagaaga aaaaaaaaag tggaggggct 300

agggtgggaa tttggaagaa tacagttata ttgagcattg agcaagttga tagaaagctt 360

ctcaatttgt acaaaatttg catccacatg attattaaag acgtagacag cacttcttcc 420

ttctttttt ctataagttt cttatatatt gttcttcatg ttttaatatt attactttat 480

gtacgcgtct aacagtagtc ctcccaaact gctataaata gagcctcttc aacgcacctc 540

ttggcagtac aaaaattatt catctcttct aagttctaat tttctaagca ttcagtaaaa 600

gaactaacc 609

<210> 4
<211> 956
<212> DNA
<213> Glycine max

<400> 4
gcattcagta aaagaactaa acatggcaga gaccattcgt ttggctgttg ctgttcttgg 60

caatgcagcc tcagttgccc tttatgctgc accaatggtt acctttagaa gagttataag 120

gaagaaaagc acagaggagt tttcatgctt tccttacatc attggcctct tgaattgtct 180

ccttttcact tggtacggtt tgcctgttgt gagttacaag tgggaaaatt tccctctcgt 240

cacagttaat ggagttggta ttgttctcga gttatcctat gttctcattt acttctggta 300

tgcttcagcc aaaggaaagg tgaaggtagc catgactgca ataccagttt tgctggtgtt 360

ctctataatt gctgcagtgt cagcttttgc attccatgat aatcatcacc ggaagcttct 420

cgtaggtagc atcggcttag gtgtttcagt aacaatgtat ggatcccctt tgattgtaat 480

gaagaaagtt atacaaacca agagtgtgga attcatgcca ctaccgttat ccatgtgctc 540

atttttagcc actgttctct ggctgattta tggacttctc attcgtgata tattcgttgc 600

gggtcctagt gcggttggaa ctcccttggg gatcttgcaa cttgtacttt actgtaaata 660

ccgaaaaggg agtgttgtgg aggatccaag taaggggac cttgagaagg gtaacttgga 720

gaaggtggaa atggaaattg ggaaagtgga aatgaatgtc acgaatcaca tgaacggaca 780

ctcgtgaaca atgcgtctaa ggggaaagat tgaagattac agaatgttct attcagattc 840

cttcttttta tgttttattt cctttatttt aagacaaaat gatccccccct tagctttggt 900

tgtattgctc acatataaat taagttatat tacttcccaa aaaaaaaaaa aaaaaa 956

<210> 5
<211> 254
<212> PRT
<213> Glycine max

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6
<211> 247
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys Gln Asp Leu Gln Val
245

<210> 7
<211> 263
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Asn Ala Ser Ser Ile
260

<210> 8
<211> 1127
<212> DNA
<213> Glycine max

<400> 8
actatagggc acgcgtggtc gacggcccgg gctggtatct ctacaaaatg gaagccacgt 60

catgaagagt atatcatttc agtaatgttt tgagacgcct ctataatgct ttaccaacaa 120

aacaaaacaa aaaaaagaac atttgaaacc atttgtatta aaaaaaaaaa ggtatattag 180

gccataatat tataggtaac atgaaatatc aaatgacacg caagagtttt gtcaaaaatg 240

aaaccatcac acatcagaga ttatggcaaa taatgttttg tgtgtctctt gcttcaccca 300

taacataagc ctctataact ggagagaaga aaaaaaaaag tggaggggct agggtgggaa 360

tttggaagaa tacagttata ttgagcattg agcaagttga tagaaagctt ctcaatttgt 420

acaaaatttg catccacatg attattaaag acgtagacag cacttcttcc ttctttttt 480

ctataagttt cttatatatt gttcttcatg ttttaatatt attactttat gtacgcgtct 540

aacagtagtc ctcccaaact gctataaata gagcctcttc aacgcacctc ttggcagtac 600

aaaaattatt catctcttct aagttctaat tttctaagca ttcagtaaaa gaactaacca 660

tggcagagac cattcgcttg ggtgttgctg ttcttggtac ttcttcgttc attcattcct 720

tagctttgaa cgtatagggt gattaattat tattcattat ttgagtcttc aaaaaaagtg 780

actcattagt accactgttt gtttttttttt ttcttgcagg caatgcagcc tcagttgccc 840

tttatgctgc accaatgtat gttacatgtt acatatataa taacattgct gcccaaatgt 900

cctccccttt agagaatgaa taaagtgctg aacgcttttt catgcttttc atgttccagg 960

gttaccttta gaagagttat aaggaagaaa agcacagagg agttttcatg ctttccttac 1020

atcattggcc tcttgaactg tctccttttc acttggtacg gtttgcctat tgttagctac 1080

aagtgggaaa atttccctct cgtcacagtt aatggagttg gtattgt 1127

<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 9
aactgcagct ccggttaaaa tgatcat 27

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 10
aaggcgcgcc ttttgatctc aaaggtggct 30

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 11
aattaattaa cgactgtctc atcatttgtg 30

<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 12
aaggcgcgcc ttgattggcc ggaagaacaa ag 32

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 13
gtaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 14
actatagggc acgcgtggt 19

<210> 15
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 15
caccagcaaa actggtattg cagtcatgg 29

<210> 16
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 16
acaataccaa ctccattaac tgtgacgaga g 31

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 17
ctgcaggaag ccacgtcatg aagag 25

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 18
ggcgcgccgg ttagttcttt tactgaatgc 30

<210> 19
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 19
acgtctgcag ctacaaaaga aacgtcgatc c 31

<210> 20
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 20
acgtctgcag catactacaa aaattaataa cagaac 36

<210> 21
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 21
acgtggcgcg ccttttgatc tcaaag 26

<210> 22
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 22
gcatctgcag cacatcagag attatg 26

<210> 23
<211> 27

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 23
gcatctgcag gacgtagaca gcacttc 27

<210> 24
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> sequência de iniciador

<400> 24
gcttgacgtc ggttagttct tttactg 27

<210> 25
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 25
wndwmvnkmd agaan 15

<210> 26
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(17)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 26
nnwmwhmwst tannnnn 17

<210> 27
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 27
wmwactdttd nnh 13

<210> 28
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(15)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 28
nbnntatawa whnnn 15

<210> 29
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(11)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 29
hawhttawtn n 11

<210> 30
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(7)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 30
dnwrnnntta adwdhdn 17

<210> 31
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 31
nnaamwnwnn dnwnwnrrd 19

<210> 32
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 32
nnnatdatta n 11

<210> 33
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 33
dwwdwhwaam wbwanwd 17

<210> 34
<211> 15
<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<400> 34
wraaavttwd agaad 15

<210> 35
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 35
rramwacwst takmynh 17

<210> 36
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<400> 36
wmwactdtta kwh 13

<210> 37
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<400> 37
hydhtatawa tabrs 15

<210> 38
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<400> 38
waawttawtm h 11

<210> 39
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 39
wnwrdtwtta awwdwwv 17

<210> 40
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<400> 40
kraaatwakr rywtwraak 19

<210> 41
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 41
ymratdatta n 11

<210> 42
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de consenso IUPAC

<400> 42
wattwwtaaa wgwayaw 17

<210> 43
<211> 190
<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(21)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (97)..(131)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (147)..(154)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (172)..(172)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (188)..(190)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 43
caaaaattaa taacagannn ntgtattttt aaaatttaat atttaatacc attatttcat 60

aatttattat acttttatta attttgtaat tattggnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120

nnnnnnnnnn ntcgatatat atacgcnnnn nnnnagaaaa cacttagctc anattctctc 180

actttctnnn 190

<210> 44
<211> 211
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(61)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (77)..(161)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 44
attctaaaat ttccannnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

naaaaactta gagaagnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ntagatgatt atttttaaat 180

gaacattaaa gaaaaactat tatatatata c 211

<210> 45
<211> 157
<212> DNA
<213> Glycine max

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(37)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(57)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (75)..(81)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (97)..(124)
<223> n é a, c, g, ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (136)..(139)
<223> n é a, c, g, ou t

<400> 45
tttctataag tttctnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnaat attattacnn nnnnnnngcg 60

tctaacagta gtccnnnnnn nctgctataa atagagnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120

nnnnaaaatt attcannnnt tctaagttct aattttc 157