



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 204**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99942392 .4**
96 Fecha de presentación : **18.08.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1104481**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2001**

54 Título: **Vectores de expresión para plantas.**

30 Prioridad: **19.08.1998 US 97150 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.09.2011

73 Titular/es: **MONSANTO TECHNOLOGY L.L.C.**
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, Missouri 63167, US

72 Inventor/es: **Conner, Timothy, W. y**
Santino, Colleen, G.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 204 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vectores de expresión para plantas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a la ingeniería genética de plantas. Más particularmente, hace referencia a sistemas de expresión génica mejorados para plantas transgénicas que usan diferentes combinaciones de elementos genéticos en un módulo de expresión de planta. La presente invención se refiere también a moléculas de ADN recombinantes que contienen una combinación específica de elementos genéticos y a células de planta y a plantas transformadas con las moléculas de ADN.

Antecedentes de la invención

10 Los recientes avances en la ingeniería genética han proporcionado las herramientas necesarias para transformar plantas para contener genes extraños. Al construir un gen de planta recombinante deseado e introducirlo en células de planta, es ahora posible generar plantas transgénicas que tienen características únicas de importancia agronómica.

15 Los elementos genéticos consistentes y fiables para uso en la construcción de genes de planta recombinantes son de gran valor en la ingeniería genética de plantas. Muchos de dichos elementos pueden potenciar los niveles de expresión génica de un gen de interés particular. Al hacer esto, estos elementos proporcionan varias ventajas. En primer lugar, al proporcionar niveles de expresión mejorados, las combinaciones óptimas de elementos genéticos pueden dar como resultado un fenotipo más pronunciado. Esto es debido a la relación observada en muchos casos entre el nivel de expresión transgénica en una planta transgénica y el grado en que se altera una característica de planta deseada.

20 En segundo lugar, los elementos genéticos no traducidos que son capaces de potenciar la expresión pueden minimizar algunas de las etapas limitantes de la velocidad en la producción de plantas transgénicas. Cuanto mayores sean los niveles de expresión alcanzables, menor número de plantas tienen que producirse y cribarse para recuperar aquellas que producen cantidades de una proteína o molécula de ARN diana suficientes para dar como resultado el fenotipo agronómicamente deseado.

30 Finalmente, la identificación de una variedad de elementos genéticos alternativos proporciona la ventaja añadida de reducir las redundancias de elementos vectoriales. Por tanto, al introducir por ingeniería genética múltiples transgenes independientes en líneas de plantas transgénicas, el uso de elementos vectoriales de expresión alternativos en los diferentes transgenes ayudará a minimizar la inhibición dependiente de homología de la expresión génica.

Sumario de la invención

35 La invención dada a conocer en la presente memoria proporciona combinaciones novedosas de elementos genéticos para uso en la construcción de moléculas de ADN recombinantes expresables en plantas. Una molécula de ADN recombinante que contiene las combinaciones de elementos genéticos de la presente invención exhibe niveles de expresión mejorados, como se desea para la transformación y regeneración de plantas transgénicas. Los niveles de expresión mejorados alcanzables usando los elementos de esta invención proporcionan numerosas ventajas, tales como una reducción del laborioso proceso de cribado necesario para la producción de plantas transgénicas y de los fenotipos potenciados así producidos. Además, los elementos son alternativas útiles para aumentar las capacidades de apilamiento de genes de las plantas transgénicas al minimizar la repetición de secuencias que se han asociado a la inestabilidad de la expresión transgénica.

40 Por lo tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende, ligadas operativamente en dirección 5' a 3':

(a) una secuencia promotora;

(b) una secuencia líder 5' no traducida que comprende la SEQ ID NO:52;

45 (c) una primera secuencia intrónica aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen seleccionado del grupo constituido por un gen de actina de arroz, un gen de sacarosa sintasa de arroz, un gen de fenilalanina-amoniaco liasa de arroz y un gen de proteína de choque térmico de maíz;

(d) una secuencia de codificación de ADN y

50 (e) una secuencia terminadora 3' no traducida aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen seleccionado del grupo constituido por un gen de la proteína de choque térmico de trigo, un gen de ubiquitina de trigo, un gen de fructosa 1,6-bisfosfatasa de trigo, un gen de glutelina de arroz, un gen de lactato deshidrogenasa de arroz y un gen de beta-tubulina de arroz.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para proporcionar una expresión génica potenciada a plantas monocotiledóneas que comprende:

- (a) transformar células de plantas monocotiledóneas con una molécula de ADN recombinante como se define anteriormente;
- 5 (b) seleccionar las células de planta que se hayan transformado y
- (c) regenerar las células de planta seleccionadas, proporcionando una planta diferenciada.

Se proporcionan además por la invención células transformadas tales como células de planta que contienen las moléculas de ADN de la invención y los tejidos, semillas y plantas diferenciadas producidos a partir de las mismas. Finalmente, la invención proporciona plantas que comprenden las células de planta anteriores. Otros objetos, aspectos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes para los especialistas en la materia a la vista de las siguientes descripciones, ejemplos y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en la presente memoria.

- 15 La Fig. 1 ilustra el plásmido pMON19469
- La Fig. 2 ilustra el plásmido pMON26052
- La Fig. 3 ilustra el plásmido pMON26055
- 20 La Fig. 4 ilustra el plásmido pMON26054
- La Fig. 5 ilustra el plásmido pMON19433
- La Fig. 6 ilustra el plásmido pMON32502
- La Fig. 7 ilustra el plásmido pMON32506
- La Fig. 8 ilustra el plásmido pMON32509
- 25 La Fig. 9 ilustra el plásmido pMON32510
- La Fig. 10 ilustra el plásmido pMON32513
- La Fig. 11 ilustra el plásmido pMON19437
- La Fig. 12 ilustra el plásmido pMON32515
- La Fig. 13 ilustra el plásmido pMON32516
- 30 La Fig. 14 ilustra el plásmido pMON32517
- La Fig. 15 ilustra el plásmido pMON33216
- La Fig. 16 ilustra el plásmido pMON33210
- La Fig. 17 ilustra el plásmido pMON33220
- La Fig. 18 ilustra el plásmido pMON33219
- 35 La Fig. 19 ilustra el plásmido pMON47901
- La Fig. 20 ilustra el plásmido pMON47906
- La Fig. 21 ilustra el plásmido pMON47907
- La Fig. 22 ilustra el plásmido pMON47915
- La Fig. 23 ilustra el plásmido pMON47916
- 40 La Fig. 24 ilustra el plásmido pMON47917
- La Fig. 25 ilustra el plásmido pMON47919

La Fig. 26 ilustra el plásmido pMON32648

La Fig. 27 ilustra el plásmido pMON18364

La Fig. 28 ilustra el plásmido pMON19568

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención proporciona elementos genéticos para la expresión mejorada de genes de plantas recombinantes que comprenden combinaciones novedosas de intrones y elementos genéticos 5' y 3' no traducidos dados a conocer en la presente memoria. Las secuencias de ADN y procedimientos de la invención permiten la producción de plantas transgénicas que tienen niveles elevados de una molécula de ARN o proteína de interés deseada, facilitando así la introducción de rasgos agrónomicamente deseables en plantas por ingeniería genética.

10 "Gen de planta recombinante" o "molécula de ADN recombinante", como se usa en el contexto de esta invención, designa una combinación de elementos genéticos que están ligados operativamente de modo que sean capaces de expresión en una célula de planta de una molécula de ARN y/o proteína deseada. Las moléculas de ADN pueden construirse usando técnicas estándares bien conocidas por los especialistas en esta materia.

15 En general, un gen de planta recombinante comprende, ligadas operativamente de extremo 5' a 3': (1) una región promotora que causa la producción de una molécula de ARN; (2) una secuencia 5' no traducida; (3) una secuencia de codificación de ADN que codifica un ARN y/o proteína deseado y (4) una región 3' no traducida.

20 La región de un gen designada como "promotora" es responsable de la regulación de la transcripción de ADN en ARN. Los promotores comprenden la secuencia de ADN, encontrada habitualmente en dirección 5' de una secuencia de codificación, que regula la expresión de la secuencia de codificación en dirección 3' controlando la producción de ARN mensajero (ARNm) al proporcionar el sitio de reconocimiento de ARN polimerasa y/u otros factores necesarios para iniciar la transcripción en el sitio correcto. El promotor usado en un gen de planta recombinante de la invención se selecciona de modo que proporcione suficiente actividad transcripcional para conseguir los niveles de expresión deseados del gen o genes de interés.

25 Son conocidos en la materia numerosos promotores funcionales en plantas, y pueden obtenerse a partir de una variedad de fuentes tales como virus de plantas y pueden incluir, pero sin limitación, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell *et al.* 1985), el promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia (FMV) (Sanger *et al.* 1990), el promotor del virus baciliforme de caña de azúcar (Bouhida *et al.*, 1993), el promotor del virus del moteado amarillo de *Commelina* (Medberry y Olszewski 1993), el promotor fotoinducible de la subunidad pequeña de 1,5-bis-fosfato de ribulosa carboxilasa (ssRUBISCO) (Coruzzi *et al.*, 1984), el promotor de trifosfato isomerasa citosólica de arroz (TPI) (Xu *et al.* 1994), el promotor de adenina fosforribosiltransferasa (APRT) de *Arabidopsis* (Moffatt *et al.* 1994), el promotor del gen de actina 1 de arroz (Zhong *et al.* 1996), y los promotores de manopina sintasa y octopina sintasa (Ni *et al.* 1995). Todos estos promotores se han usado para crear diversos tipos de construcciones de ADN recombinante expresables en plantas. Se ha efectuado un análisis comparativo de los promotores constitutivos mediante la expresión de genes informadores tales como el gen uidA (β -glucuronidasa) de *E. coli* con muchos de estos y otros promotores (Li *et al.* 1997; Wen *et al.* 1993). Otros promotores útiles incluyen, pero sin limitación, aquellos que se expresan de manera específica de tejido, potenciada en tejido o regulada por el desarrollo. Son también conocidos en la materia ejemplos de estos tipos de promotores.

40 Además de la secuencia promotora que regula la expresión de secuencias de ADN ligadas operativamente, otros elementos genéticos pueden desempeñar un papel en la mejora de la expresión génica. Estos elementos incluyen, pero sin limitación, regiones no traducidas y secuencias intermedias (intrones) que están asociadas a los genes con que están ligadas operativamente. Por "asociado a" como se usa en la presente memoria se entiende que el elemento genético se encuentra típicamente asociado a un gen durante el procesamiento del gen, tal como durante el procesamiento de transcripción o traducción.

45 Las regiones 5' no traducidas de un ARNm pueden desempeñar un papel importante en la iniciación de la traducción y, por lo tanto, en la regulación de la expresión génica. Una secuencia líder 5' no traducida se caracteriza como aquella porción de la molécula de ARNm que se extiende lo más típicamente a partir del sitio 5' CAP hasta el codón de iniciación de la traducción de proteína AUG. Para la mayoría de ARNm eucarióticos, la traducción se inicia con la unión de la proteína de unión CAP a la caperuzita de ARNm. A esto sigue entonces la unión de varios otros factores de traducción, así como del complejo de preiniciación de ribosoma de 43S. Este complejo se desplaza por la molécula de ARNm rastreando un codón de iniciación AUG en un contexto de secuencia apropiado. Una vez se ha encontrado éste, y con la adición de la unidad ribosómica de 60S, el complejo de iniciación de 80S completo inicia la traducción de proteína (Pain, 1986; Moldave, 1985; Kozak, 1986). Se ha identificado una segunda clase de ARNm que posee distintas características de iniciación de la traducción. La traducción a partir de estos ARNm se inicia de manera independiente de CAP y se cree que se inicia con la unión del ribosoma a porciones internas de la secuencia líder 5' no traducida (Sonenberg, 1990; Carrington y Freed, 1990; Jackson *et al.*, 1990).

La eficacia de la iniciación de la traducción puede influirse por características de la secuencia líder 5' no traducida, por lo tanto, la identificación y optimización de las secuencias líder 5' pueden proporcionar niveles potenciados de

expresión génica en plantas transgénicas. Por ejemplo, algunos estudios han investigado el uso de secuencias líder 5' no traducidas de virus de planta por sus efectos sobre la expresión génica de plantas (Gallie *et al.*, 1987; Jobling y Gehrke, 1987; Skuzeski *et al.*, 1990). Se han notificado aumentos en la expresión génica usando la secuencia líder omega del virus del mosaico del tabaco (TMV). Cuando se comparó con otras secuencias líder víricas, tales como la

5 secuencia líder RNA 4 del virus del mosaico de la alfalfa (AMV), se observaron mejoras de dos a tres veces en los niveles de expresión génica usando la secuencia líder omega de TMV (Gallie *et al.*, 1987; Skuzeski *et al.*, 1990). Se ha demostrado también que las secuencias líder 5' no traducidas asociadas a genes de proteína de choque térmico potencian significativamente la expresión génica en plantas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.362.865).

La mayoría de secuencias 5' no traducidas son muy ricas en A-U y se predice que carecerán de estructura secundaria significativa. Una de las etapas tempranas de la iniciación de la traducción es la relajación o desenrollamiento de la estructura secundaria de ARNm (Sonenberg, 1990). Las secuencias líder de ARN mensajero con estructura secundaria de ARNm despreciable pueden no requerir esta etapa de desenrollamiento adicional y por lo tanto pueden ser más accesibles para los componentes de iniciación de la traducción. Introducir secuencias que pueden formar estructuras secundarias estables puede reducir el nivel de expresión génica (Kozak, 1988; Pelletier y Sonenberg, 1985). La capacidad de la secuencia líder 5' no traducida de interactuar con los componentes de traducción puede desempeñar un papel clave afectando a los niveles de expresión génica consiguiente.

10

15

Las regiones 5' no traducidas que se emplean en esta invención son capaces de aumentar el nivel de expresión de una secuencia transcribible con la que están ligadas operativamente. La región 5' no traducida puede estar asociada a un gen de una fuente que es nativa o es heteróloga con respecto a los demás elementos no traducidos y/o traducidos presentes en el gen recombinante.

20

Las secuencias líder 5' no traducidas proporcionadas por esta invención son una región 5' no traducida asociada al gen de la proteína de unión a/b a clorofila de trigo (líder 5' Ta cab), que comprende la SEQ ID NO: 52.

La primera secuencia intrónica, designada de aquí en adelante en la presente memoria como la secuencia intermedia, es también capaz de aumentar la expresión génica. Los intrones pueden mejorar la eficacia del procesamiento de ARNm. Se ha notificado que una serie de intrones aumentan la expresión génica, particularmente en monocotiledóneas. En un informe, la presencia del intrón 1 de catalasa (Tanaka, 1990) aislado a partir de ricino daba como resultado un aumento de la expresión génica en arroz, pero no en tabaco, cuando se usaba GUS como gen marcador. Se han conseguido aún más mejoras adicionales, especialmente en plantas monocotiledóneas, mediante construcciones génicas que tienen intrones en la secuencia líder 5' no traducida situada entre el promotor y la secuencia de codificación estructural. Por ejemplo, Callis *et al.*, (1987) han notificado que la presencia de intrones de alcohol deshidrogenasa (Adh-1) o intrones de Bronze-1 daba como resultado mayores niveles de expresión. Mascarenhas *et al.*, (1990) han notificado una potenciación de 12 veces de la expresión de CAT mediante el uso del intrón Adh. Otros intrones adecuados para uso en las moléculas de ADN de la invención incluyen, pero sin limitación, el intrón de sacarosa sintasa (Vasil *et al.*, 1989), el intrón omega de TMV (Gallie *et al.*, 1989), el intrón hsp70 de maíz como se muestra en la SEQ ID NO: 47 (patente de EE.UU. n° 5.593.874 y patente de EE.UU. n° 5.859.347) y el intrón de actina de arroz (McElroy *et al.*, 1990). Una serie de factores pueden influir en el grado de potenciación de la expresión génica por un intrón incluyendo, pero sin limitación, el promotor (Jefferson *et al.*, 1987), las secuencias exónicas flanqueantes y la situación o localización del intrón en relación con el gen (Mascarenhas *et al.*, 1990).

25

30

35

Las secuencias intermedias proporcionadas por la presente invención están asociadas a genes de trigo y arroz específicos, en particular la secuencia intermedia de la proteína de choque térmico de maíz que comprende la SEQ ID NO: 47, la secuencia intermedia del gen de actina de arroz que comprende la SEQ ID NO: 50, la secuencia intermedia del gen de fenilalanina-amoniaco liasa de arroz que comprende la SEQ ID NO: 48 y la secuencia intermedia del gen de sacarosa sintasa de arroz que comprende la SEQ ID NO:51.

40

Las secuencias no traducidas localizadas en el extremo 3' de un gen pueden influir también en los niveles de expresión. Una región 3' no traducida comprende una región del ARNm que empieza generalmente con el codón de terminación de la traducción y se extiende al menos más allá del sitio de poliadenilación. Ingelbrecht *et al.* (Plant Cell 1: 671-80, 1989) han evaluado la importancia de estos elementos y han encontrado grandes diferencias en la expresión de plantas estables dependiendo de la fuente de la región 3' no traducida. Usando regiones 3' no traducidas asociadas a la octopina sintasa, la proteína de semilla de 2S de *Arabidopsis*, la subunidad pequeña de rbcS de *Arabidopsis*, la extensina de zanahoria y la calcona sintasa de *Antirrhinum*, se observó una diferencia de 60 veces entre la construcción de mejor expresión (que contenía la región 3' no traducida de rbcS) y la construcción de menor expresión (que contenía la región 3' de calcona sintasa). La región 3' no traducida del gen de nopalina sintasa del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (nos 3') que comprende la SEQ ID NO:46 se ha usado también como

45

50

55

región terminadora para la expresión de genes en plantas. Aunque resulta evidente que las regiones 3' no traducidas pueden afectar significativamente a la expresión de genes de plantas recombinantes, es un tema mal comprendido su papel exacto y cómo identificarlas y optimizarlas mejor para expresión máxima.

La secuencia de codificación de ADN de una molécula de ADN recombinante de la invención puede codificar cualquier secuencia de ácido nucleico transcribible incluyendo, pero sin limitación, aquellas que codifican proteínas nativas, extrañas y/o modificadas de interés. La selección de esta secuencia dependerá de los objetivos para una

60

aplicación dada. Típicamente, la secuencia de ADN estructural codifica una molécula de proteína capaz de modificar una o más características de planta. Los genes estructurales adecuados pueden incluir, pero sin limitación, genes para controlar insectos y otras plagas, genes para controlar enfermedades microbianas y fúngicas, genes para tolerancia a herbicida y genes para mejoras de la calidad de la planta, tales como aumentos de rendimiento, tolerancias ambientales y potenciación nutricional. Los genes pueden aislarse de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitación, plantas y bacterias.

Como alternativa, la secuencia de codificación de ADN puede afectar a estos fenotipos codificando una molécula de ARN no traducible que causa la inhibición orientada de la expresión de un gen endógeno, por ejemplo mediante mecanismos mediados por anticodificación o cosupresión (véanse, por ejemplo, Schuch, 1991; Bird, 1991; Jorgensen, 1990). El ARN podría ser también una molécula de ARN catalítica (concretamente, una ribozima) modificada por ingeniería genética para escindir un producto de ARNm endógeno deseado (véase, por ejemplo, Gibson, 1997).

La región 3' no traducida que se emplea en una molécula de ADN descrita en la presente memoria causa generalmente la poliadenilación del extremo 3' de la secuencia de ARNm transcrita y la terminación de la transcripción. La región 3' no traducida puede estar asociada al gen de una fuente que es nativa o que es heteróloga con respecto a los demás elementos no traducidos y/o traducidos presentes en la molécula de ADN.

Las secuencias 3' no traducidas proporcionadas por la presente invención se asocian a genes de trigo y arroz específicos, en particular se seleccionan de secuencias 3' no traducidas aisladas a partir de una secuencia nucleotídica asociada a fructosa 1,6-bisfosfatasa de trigo (Ta fbp 3') que comprende la SEQ ID NO: 60, una proteína de choque térmico de trigo (Ta hsp 3') que comprende la SEQ ID NO: 58, una ubiquitina de trigo (Ta ubiq 3') que comprende la SEQ ID NO:59, una proteína glutelina de arroz (r glut 3') que comprende la SEQ ID NO: 61, una lactato deshidrogenasa de arroz (r laced 3') que comprende la SEQ ID NO:62 y una beta-tubulina de arroz (r btub 3') que comprende la SEQ ID NO:63.

Las secuencias 5' y/o 3' no traducidas y secuencias intermedias de esta invención pueden aislarse mediante uno o más de los numerosos procedimientos conocidos por los especialistas en la materia o, como alternativa, pueden generarse sintéticamente.

En una realización, el material de planta fuente es ARN de planta aislado de tejido de planta. En otra realización, el material de fuente es una secuencia de ADN sintético. Las secuencias de molde para los elementos genéticos incluyen transcritos de ARN, secuencias de ADNc o ADN genómico. En otra realización, se sintetizan cebadores de PCR para generar los elementos genéticos de la presente invención. Los cebadores de PCR pueden sintetizarse para corresponder a los extremos de las regiones 5' no traducidas o 3' no traducidas de los transcritos de planta diana. Por ejemplo, pueden clonarse en un vector de expresión para ensayo reacciones de PCR en productos de ADNc de la primera cadena generados mediante la transcripción inversa de ARN y fragmentos de PCR que contienen la porción o elemento genético entero deseado.

Son conocidos por los especialistas en la materia los procedimientos para el aislamiento de genes y elementos genéticos asociados e incluirían, por ejemplo, los procedimientos de PCR dados a conocer en la presente memoria. Son conocidos una variedad de procedimientos de amplificación en la materia y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 4.683.195 y 4.683.202 e Innis *et al.*, 1990. Los especialistas en la materia están familiarizados con los materiales de recurso estándar que describen condiciones y procedimientos específicos para la construcción, manipulación y aislamiento de macromoléculas (por ejemplo, moléculas de ADN, plásmidos, etc.), la generación de organismos recombinantes y el cribado y aislamiento de genes (véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989; Mailga *et al.*, 1995; Birren *et al.*, 1996).

Se han descrito también procedimientos moleculares de plantas, por ejemplo, en Pouwels *et al.*, 1985, sup. 1987; Weissbach y Weissbach, 1989 y Gelvin *et al.*, 1990.

Además, un especialista en la materia reconocerá que pueden modificarse las regiones 5' y/o 3' no traducidas o intermedias de la invención, tal como mediante adición, delección, sustitución de bases, etc., y seguir proporcionando los beneficios dados a conocer en la presente memoria. Dichas modificaciones se consideran dentro de alcance de esta invención.

Un tipo de modificación, por ejemplo, podría implicar cambios en la secuencia nucleotídica de la secuencia líder que conducen a un cambio en la estructura secundaria. Puede ser necesaria una estructura secundaria apropiada de la secuencia líder 5' para una expresión óptima. Como tal, la secuencia nucleotídica específica de la secuencia líder puede ser importante en la medida en lo que se refiere a la estructura secundaria. Por lo tanto, la secuencia líder puede tolerar de hecho modificaciones de la secuencia nucleotídica que no den como resultado cambios en la estructura secundaria. De forma similar, los intrones y secuencias 3' no traducidas de la presente invención pueden modificarse en consecuencia para mejorar la expresión génica en un sistema particular.

Las secuencias que rodean el AUG de una región 5' no traducida pueden afectar también a la eficacia de traducción. Por ejemplo, se ha identificado una secuencia consenso en plantas que puede proporcionar un contexto de AUG óptimo (Joshi *et al.*, 1987; Koziel *et al.*, 1996). Por tanto, esta región de las secuencias 5' no traducidas de la

invención puede modificarse para optimizar adicionalmente los niveles de expresión transgénica. Además, pueden hacerse modificaciones a los demás componentes genéticos incluyendo, pero sin limitación, la región 3' no traducida o secuencias intermedias de la molécula de ADN recombinante de la invención, de tal modo que se optimicen adicionalmente las combinaciones novedosas de elementos en el vector de expresión.

- 5 Además de aquellos elementos debatidos anteriormente, una molécula de ADN recombinante de la invención puede incluir también otros elementos reguladores tales como secuencias de secuestramiento de/orientación a cloroplastos, elementos potenciadores, etc. (para revisar la optimización de la expresión transgénica, véase Kozziel *et al.*, 1996). Por ejemplo, se han obtenido mejoras de la expresión usando secuencias potenciadoras insertadas 5' al promotor.
- 10 Una molécula de ADN recombinante de la invención puede incluir también un marcador seleccionable. Estos marcadores se usan comúnmente para seleccionar plantas transformadas o células de planta que contienen el material genético exógeno de interés, concretamente, el transgén. Dichos ejemplos incluyen, pero sin limitación, un gen de neomicina (neo) fosfotransferasa (Potrykus *et al.*, 1985), que confiere resistencia a kanamicina. Las células que expresan el gen de neomicina fosfotransferasa pueden seleccionarse usando un antibiótico apropiado tal como kanamicina o G418. Otros marcadores seleccionables usados comúnmente incluyen el gen *bar*, que confiere resistencia a bialafos; un gen de EPSP sintasa mutante (Hinchee *et al.*, 1988), que confiere resistencia a glifosato; un gen de nitrilasa, que confiere resistencia a bromoxinilo (Stalker *et al.*, 1988); un gen de acetolactato sintasa (ALS) mutante, que confiere resistencia a imidazolinona o sulfonilurea (solicitud de patente europea 154.204, 1985) y un gen DHFR resistente a metotrexato (Thillet *et al.*, 1988).
- 15
- 20 Una molécula de ADN recombinante de la invención puede incluir también un marcador cribable como medio adicional mediante el que puede evaluarse la expresión génica. Los marcadores cribables comunes incluyen un gen de β -glucuronidasa o uidA (GUS), que codifica una enzima para la que son conocidos diversos sustratos cromogénicos (Jefferson, 1987; Jefferson *et al.*, 1987); un gen de luciferasa (Ow *et al.*, 1986); un gen de locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos de planta (Dellaporta 1988); un gen de β -lactamasa (Sutcliffe *et al.*, 1978), que codifica una enzima para la que son conocidos diversos sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen xylE (Zukowsky *et al.*, 1983), que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir catecoles cromogénicos; un gen de α -amilasa (Ikata *et al.*, 1990); un gen de tirosinasa (Katz *et al.*, 1983), que codifica una enzima capaz de oxidar tirosina a DOPA y dopaquinona, que a su vez se condensa a melanina; un gen de α -galactosidasa, que codifica una enzima cuyo sustrato es α -galactosa cromogénica, etc.
- 25
- 30

Los términos "seleccionable" y "cribable" se pretende que comprendan también genes que codifican marcadores "valorables" cuya secreción puede detectarse como medio para identificar o seleccionar células transformadas. Los ejemplos incluyen marcadores que codifican un antígeno secretable que puede identificarse por interacción con anticuerpo, o incluso enzimas secretables que pueden detectarse catalíticamente. Las proteínas secretables entran dentro de una serie de clases, incluyendo proteínas pequeñas difusibles detectables, por ejemplo, por ELISA; enzimas pequeñas activas detectables en solución extracelular (por ejemplo, α -amilasa, β -lactamasa, fosfinotricina transferasa), o proteínas que se insertan o atrapan en la pared celular (tales como proteínas que incluyen una secuencia líder tal como se encuentra en la unidad de expresión de extensina o PR-S de tabaco). Otros posibles genes marcadores seleccionables/cribables/valorables resultarán evidentes para los especialistas en la materia.

35

- 40 Están comercialmente disponibles una amplia variedad de procedimientos y herramientas de clonación y se han descrito extensamente (véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989; Birren *et al.*, 1996). Dichos procedimientos son bien conocidos y pueden usarse fácilmente por los especialistas en la materia en la construcción de moléculas de ADN de esta invención.

- 45 Puede usarse cualquier tipo de vector en la presente invención incluyendo, pero sin limitación, un vector de expresión plasmídico de *E. coli*. Más preferiblemente, las combinaciones de elementos genéticos de la presente invención están ligadas operativamente en un vector de transformación de planta. Al construir una molécula de ADN recombinante de la invención, los diversos componentes o fragmentos de la misma se insertan típicamente, usando procedimientos conocidos por los especialistas en la materia, en un vector de clonación conveniente que es capaz de replicación en un hospedador bacteriano tal como *E. coli*. Existen numerosos vectores que se han descrito en la bibliografía. Después de cada subclonación, el vector puede aislarse y someterse a manipulación adicional, tal como digestión por restricción, inserción de nuevos fragmentos, ligamiento, delección, resección, inserción, mutagénesis *in vitro*, adición de fragmentos de poliligador y similares, para proporcionar un vector que satisfaga una necesidad particular. Una vez completada la construcción, puede transferirse la construcción a un vector apropiado para manipulación adicional según la manera de transformación de la célula de planta. Se han descrito una serie de vectores de transformación de planta, y el vector particular puede modificarse dependiendo del procedimiento de transformación. En una realización, puede usarse un vector de transformación de planta adecuado para la transformación de planta mediada por *Agrobacterium*. En otra realización, puede usarse un vector de transformación de planta adecuado para bombardeo de partículas. Un vector de expresión de planta típico para transformación de planta mediada por *Agrobacterium* puede incluir, por ejemplo, una serie de componentes genéticos incluyendo, pero sin limitación, un promotor, uno o más genes de interés y una secuencia terminadora.
- 50
- 55
- 60

Se entiende por componente genético como se usa en la presente memoria cualquier secuencia de ácido nucleico o elemento genético que pueda ser también un componente o parte de un vector. El vector de expresión de planta puede contener también las funciones de movilización de *E. coli* a *Agrobacterium* y de replicación del vector en estos hospedadores (concretamente, un origen de replicación de *E. coli* y de un amplio intervalo de hospedadores).

Además, uno o más genes marcadores seleccionables para la selección de células bacterianas que contienen el vector y para la selección de células de planta que contienen el ADN introducido pueden ser componentes del vector de expresión de planta. El vector puede contener típicamente también uno o más márgenes de ADN-T, que actúan transfiriendo el ADN a la célula de planta. Se ha descrito una serie de vectores adecuados para la transformación estable de células de planta o para el establecimiento de plantas transgénicas, por ejemplo, en Pouwels *et al.*, "Cloning Vectors: A Laboratory Manual", 1985, sup. 1987; Weissbach y Weissbach, "Methods for Plant Molecular Biology", Academic Press, 1989; Gelvin *et al.*, "Plant Molecular Biology Manual". Kluwer Academia Publishers, 1990 y R.R.D. Croy "Plant Molecular Biology LabFax", BIOS Scientific Publishers, 1993. Puede diseñarse el vector de transformación de planta óptimo para un procedimiento de suministro de ADN particular y un cultivo diana de interés.

Están también comprendidos por la presente invención células bacterianas o víricas que comprenden moléculas de ADN que contienen secuencias no traducidas de la presente invención. La introducción de dichos vectores en un hospedador puede conseguirse usando procedimientos conocidos por los especialistas en la materia.

Puede insertarse una molécula de ADN de la presente invención en el genoma de una planta mediante cualquier procedimiento adecuado. Los procedimientos de transformación de planta adecuados incluyen transformación mediada por *Agrobacterium*, el uso de liposomas, electroporación, compuestos químicos que aumentan la captación de ADN libre, suministro de ADN libre mediante bombardeo de microprojectiles, la transformación usando virus o polen, etc.

Los procedimientos para transformar específicamente dicotiledóneas usan principalmente *Agrobacterium tumefaciens*. Por ejemplo, las plantas transgénicas notificadas incluyen, pero sin limitación, algodón (patente de EE.UU. nº 5.004.863, patente de EE.UU. nº 5.159.135, patente de EE.UU. nº 5.518.908, WO 97/43430) y soja (patente de EE.UU. nº 5.569.834, patente de EE.UU. nº 5.416.011). De forma similar, están disponibles una serie de procedimientos de transformación y regeneración para monocotiledóneas que incluyen, pero sin limitación, maíz (Songstad *et al.* 1995; Klein *et al.*, 1988); arroz (Toriyama *et al.* 1986) y trigo (Cheng *et al.* 1997; y la patente de EE.UU. nº 5.631.152). Resulta evidente para los especialistas en la materia que puede usarse una serie de metodologías de transformación y regeneración y modificarse para la producción de plantas transgénicas estables de cualquier número de cultivos diana de interés, y los procedimientos de transformación y regeneración de planta son bien conocidos por el especialista (por ejemplo véanse Hinchee *et al.* (1994) y Ritchie y Hodges (1993) para revisiones).

Se han desarrollado ensayos de expresión génica basándose en la expresión transitoria de construcciones de ácido nucleico clonados introduciendo las moléculas de ácido nucleico en células de planta mediante tratamiento con polietilenglicol, electroporación o bombardeo de partículas (Marcotte *et al.*, (1988), Marcotte *et al.*, (1989), McCarty *et al.*, (1991), Hattori *et al.*, (1992), Goff *et al.*, (1990)). Pueden usarse sistemas de expresión transitoria para evaluar rápidamente los niveles de expresión génica y diseccionar funcionalmente las construcciones génicas (véase en general Mailga *et al.*, (1995)).

La presente invención proporciona también células de planta cuyo genoma contiene una o más moléculas de ADN recombinante que comprenden una secuencia 5' y/o 3' no traducida descrita en la presente memoria. Las plantas diferenciadas que comprenden dichas células tendrán las características o beneficios proporcionados por la expresión de la secuencia de codificación de ADN que está ligada operativamente a dichas secuencias. Dichas plantas pueden ser monocotiledóneas y pueden incluir, pero sin limitación, plantas pertenecientes a familias seleccionadas de arroz, centeno, sorgo, caña de azúcar, trigo, plátano y céspedes. Las plantas particularmente preferidas incluyen cebada, maíz, arroz, centeno y trigo. Las plantas aún más preferidas incluyen monocotiledóneas tales como maíz, trigo y arroz.

La invención se entenderá más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos. Los ejemplos no cubiertos por las reivindicaciones adjuntas se han mantenido con fines ilustrativos.

Además de los procedimientos referidos específicamente en la presente memoria, los profesionales están familiarizados con los materiales de recurso estándar que describen condiciones y procedimientos para la construcción, manipulación y aislamiento de macromoléculas (por ejemplo, moléculas de ADN, plásmidos, etc.), para la generación de organismos recombinantes y para el cribado y aislamiento de clones (véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, (1989); Mailga *et al.*, (1995); Birren *et al.*, (1996)).

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de vectores de expresión que contienen combinaciones de elementos genéticos para una expresión transgénica mejorada

Se efectuó la construcción de los vectores de expresión que contienen módulos de elementos genéticos que comprenden elementos de trigo o arroz asociando oligonucleótidos sintéticos o mediante aislamiento por PCR de ARNm de hoja de trigo o ADN genómico de arroz y ligamiento en sitios de restricción en dirección 5' y 3', respectivamente, del gen informador GUS. Se enumeran en la Tabla 1 los plásmidos usados para clonación y construcción de los diversos módulos de expresión. Todas las construcciones ensayadas tenían el promotor e35S, que es el promotor de ARN de 35S de CaMV que contiene una duplicación de la región de -90 a 300. Otros elementos contenidos en los plásmidos incluyen los siguientes: orígenes de replicación (ori-M13 y ori-V), genes marcadores tales como GUS o LUC, que son las secuencias de codificación de beta-glucurodinasa y luciferasa, respectivamente, y las secuencias de codificación para selección de antibióticos AMP (selección bacteriana) y KAN (confiere resistencia a los antibióticos aminoglicosídicos neomicina y kanamicina). El plásmido pMON32648 (Fig. 26) contiene una proteína antifúngica de festuca alta (Tfe AFP) como se describe en la solicitud de patente 60/097150. Los vectores de transformación típicos adicionales incluyen, pero sin limitación, pMON18364 (Fig. 27), que es un vector de transformación de *Agrobacterium* de doble margen, y pMON19568 (Fig. 28), que es un plásmido que se linealiza antes de un procedimiento de transformación por bombardeo de partículas. Las condiciones de PCR usadas fueron las recomendadas por el fabricante (véase, por ejemplo, Strategene, La Jolla, CA, PE Biosystems, Foster City, CA). Se aisló ADN plasmídico y se purificó usando kits comercialmente disponibles (véase, por ejemplo, Qiagen, Valencia, CA). Se adquirió ADN sintético en Midland Certified Reagent Co., Midland, TX).

TABLA 1. Construcción de vectores *

Construcción	(secuencia líder 5' / intrón / marcador / s. terminadora 3')**	Sitios de clonación (elemento genético)
pMON 19469*	ninguna / hsp70 I / GUS / nos 3' (Fig. 1)	BgIII , NcoI (hsp70 I)
pMON26043	ninguna / GUS / nos 3'	BgIII, NcoI, XbaI
pMON26052*	Ta hsp L / hsp70 I / GUS / nos 3' (Fig. 2)	BgIII, NcoI (hsp70 I)
pMON25454	vector intrónico de actina de arroz	Stu I / Nco I (ract I)
pMON26044	Ta cab L / ract I I / GUS / nos 3'	NcoI / Stu (ract I I), EcoRI/Sma (nos3')
pMON26055*	Ta hsp L / ract I / GUS / nos 3' (Fig. 3)	Stu I / NcoI (ract I)
pMON26045	Ta fbp L / GUS / nos 3'	HindIII, Xba, BgIII, NcoI
pMON25456	ninguna / ract I / GUS / nos 3'	HindIII / BclI (e35S/ract I)
pMON26064	ract I / Ta fbp L / GUS / nos 3'***	HindIII, Xba, BclI
pMON26054*	Ta cab L / ract I / GUS / nos 3'	StuI/NcoI (ract I), véase la Fig.4 EcoRI/SmaI (nos 3')
pMON26038	Ta cab L / GUS / nos 3'	XbaI, BgIII, NcoI, PstI, (Pst/BgIII, nos 3')
pMON19433*	ninguna / hsp70 I / GUS / nos 3'	EcoRI/Bam HI (nos 3') BgIII/EcoRI, véase la Fig. 5
pMON18375	ninguna / hsp70 I / GUS / Ta hsp17 3'	EcoRI / SmaI (Ta hsp17 3')
pMON32502*	Ta cab L / ract I / GUS / Ta hsp17 3'	véase la Fig. 6
pMON32506*	Ta hsp L / ract I / GUS / Ta hsp17 3'	véase la Fig. 7
pMON18377	ninguna / hsp70 I / GUS / Ta ubiq 3'	EcoRI / Sma I (Ta ubiq 3')
pMON32509*	Ta fbp L / ract I / GUS / Ta ubiq 3'	véase la Fig. 8
pMON32510*	Ta hsp L / ract I / GUS / Ta ubiq 3'	véase la Fig. 9
pMON18379	none / hasp70 / GUS / Ta fbp 3'	
pMON32513*	Ta fbp L / ract I / GUS / Ta fbp 3'	véase la Fig. 10
pMON 19437*	none / hsp70 I / LUX / nos 3'	NcoI / EcoRI (LUX) véase la Fig. 11

(CONT)

pMON32515*	Ta cab L / ractl I / LUX / Ta hsp 3'	NcoI / EcoRI (LUX) véase la Fig. 12
pMON32516*	Ta fbp L / ractl I / LUX / Ta ubiq 3'	NcoI / EcoRI (LUX) véase la Fig. 13
pMON32517*	Ta fbp L / ractl I / LUX / Ta fbp 3'	NcoI / EcoRI (LUX) véase la Fig. 14
pMON32518*	Ta fbp L / ractl I / LUX / r lac d 3'	véase la Fig. 15
pMON33210*	none/ hsp70 I / GUS/ nos	PmlI, BglII, XbaI (r btubL) véase la Fig. 16
pMON33220*	r btub L / hsp70 I / GUS / nos 3'	véase la Fig. 17
pMON26046	Ta per L / none / GUS/ nos	BglII/NcoI (Ta per L) PstI/BglII
pMON3321	ninguna/ r army I I GUS / nos 3'	BglII / XbaI (r amy I)
pMON33226	ninguna/ r pal I / GUS / nos 3'	BglII / Xba (r pal 1)
pMON33228	ninguna/ r ssl I / GUS / nos 3'	BglII / Xba (r ssl I)
pMON33225	Ta cab L / ractl I / GUS / r glut 3'	EcoRI / Sph (r glut 3')
pMON33200	ninguna / hsp70 I / GUS / nos 3'	BglII / Pml I
pMON33219*	r amy L / hsp70 I / GUS/ nos	véase la Fig. 18
pMON47901*	Ta cab L/ hsp70 I / GUS / glut 3'	véase la Fig. 19
pMON47906*	Ta hsp L / ractl I / GUS / r lac d 3'	véase la Fig. 20
pMON47907*	Ta hsp L/ ractl I / GUS / r glut 3'	véase la Fig. 21
pMON47915	Ta per L / ractl I / GUS / r lac d 3'	véase la Fig. 22
pMON47916*	Ta per L / ractl I / GUS / r glut 3'	véase la Fig. 23
pMON47917*	Ta per L / ractl I /GUS / r btub 3'	véase la Fig. 24
pMON47919*		véase la Fig. 25
pMON47909	Ta hsp L / ractl I / GUS / r lac d 3'	BglII/NcoI
pMON33216	Ta cab L/ ractl II GUS / r btub 3'	StuI/ NcoI
pMON47910	Ta hsp L / ractl I / GUS / r glut 3'	NcoI / BglII (hsp70 I)
pMON47918	Ta per L / hsp70 I / GUS / r lac d 3'	NcoI / BglII (hsp70 I)
pMON47920	Ta per L / hsp70 I / GUS / r btub	BglII / NcoI (hsp70 I)

* Figura

** Orientación diferente: intrón / líder /marcador / 3'

Se muestra en la SEQ ID NO: 47 la secuencia intermedia de la proteína de choque térmico de maíz (intrón hsp70), como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.593.874 y 5.859.347. Se muestra en la SEQ ID NO:45 la secuencia líder sintética básica. Se creó la secuencia líder 5' no traducida a partir del ARNm de trigo de la supuesta proteína de choque térmico de bajo peso molecular (5' Ta hsp17 L) (nº de acceso a Genbank X13431.gb_pl) (SEQ

ID NO:53), asociando las SEQ ID NO. 5, SEQ. ID NO. 6, SEQ ID NO.7 y SEQ ID NO. 8. El extremo 5' del fragmento resultante tiene un extremo cohesivo BamHI y está seguido por un sitio de restricción XbaI, y el extremo 3' tiene un sitio BglIII seguido por un extremo cohesivo NcoI con fines de subclonación. Se ligó este fragmento con el fragmento BglIII-NcoI de 5,676 kb de pMON19469 (Figura 1), creando pMON26043.

- 5 Se creó el plásmido pMON26052 (Figura 2) subclonando el fragmento BglIII-NcoI de 884 pb de pMON19469 (Figura 1) en los sitios BglIII y NcoI de pMON26043. pMON26043 contenía tanto el intrón HP70 como la secuencia líder de 5' trigo (secuencia líder Ta hsp).

- 10 Se creó pMON26055 (Figura 3) subclonando el fragmento StuI-NcoI de 0,449 kb que contiene el intrón de actina de arroz (intrón ractI) (SEQ ID NO:50) (McElroy, *et al.*, 1991) de pMON25454 en los sitios BglIII y NcoI de pMON26043, usando adaptadores para el sitio StuI que crean un extremo complementario de BglIII (SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4).

- 15 Se creó la secuencia líder 5' no traducida a partir de ARNm de trigo de fructosa 1,6-bisfosfatasa (5' Ta fbp L) (nº de acceso a Genbank X07780.gb_pl) (SEQ ID NO:54), asociando las SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11 y SEQ ID NO. 12. El extremo 5' del fragmento resultante tiene un extremo cohesivo BamHI seguido por un sitio de restricción XbaI, y el extremo 3' tiene un sitio BglIII seguido por un extremo cohesivo NcoI con fines de subclonación. Se ligó este fragmento con el fragmento BglIII-NcoI de 5,676 kb de pMON19469 (Figura 1), creando pMON26045.

- 20 Se creó el plásmido pMON26064 subclonando el fragmento HindIII-BclI de 1,095 kb que contiene el intrón de actina de arroz (McElroy *et al.*, 1991) y el promotor e35S (Kay *et al.*, 1987) de pMON25456 en los sitios HindIII y XbaI de pMON26045, usando adaptadores para el sitio BclI que crean un extremo complementario de XbaI (SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14).

Se creó pMON26054 (Figura 4) subclonando el fragmento StuI-NcoI de 0,449 kb que contiene el intrón de actina de arroz (McElroy *et al.*, 1991) de pMON25454 en los sitios BglIII y NcoI de pMON26045, usando adaptadores para el sitio StuI que crean un extremo complementario de BglIII (SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4).

- 25 Se aisló la secuencia líder 5' no traducida de proteína de unión a/b a clorofila principal (5' Ta cab L) (nº de acceso a Genbank M10144.gb_pl) (SEQ ID NO:52) mediante transcripción inversa a partir de ARN de hoja de trigo seguido de 40 ciclos de PCR a una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 1 minuto, una temperatura de asociación de 50°C durante 2 minutos y una temperatura de extensión de 72°C durante 3 minutos. Los cebadores usados, de SEQ ID NO. 1 y de SEQ ID NO. 2, crean sitios de restricción BamHI y XbaI en el extremo 5', y sitios de restricción BglIII y NcoI en el extremo 3' con fines de subclonación. Se digirió entonces el fragmento de 77 pares de bases que contiene la secuencia líder 5' no traducida de la proteína de unión a/b a clorofila con BamHI y NcoI y se ligó con el fragmento BglIII-NcoI de 5,676 kb de pMON19469 (Figura 1), creando pMON26038.
- 30

Se creó el plásmido pMON26044 subclonando el fragmento StuI-NcoI de 0,449 kb que contiene el intrón de actina de arroz (McElroy *et al.*, 1991) de pMON25454 en los sitios BglIII y NcoI de pMON26038, usando los adaptadores del sitio StuI que crean un extremo complementario de BglIII (SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4).

- 35 Se aislaron las regiones 3' no traducidas que contienen secuencias terminadoras y de poliadenilación y se clonaron en pMON19433. El plásmido pMON19433 deriva de pUC119 y contiene además el promotor 35S potenciado de CAMV, el intrón hsp70, el gen informador GUS y la secuencia 3' no traducida de nopalina sintasa (nos) (SEQ ID NO:46). Este vector contiene un sitio EcoRI y un sitio BamHI que flanquean a la secuencia terminadora nos 3', permitiendo la retirada y sustitución por secuencias de terminación 3' alternativas.
- 40 usando un cebador oligo dT en tampón de reacción PCR con MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP y TTP 0,2 mM. Se añadieron 5 µg de ARN celular total de hoja de trigo al tampón de reacción PCR en un volumen de 20 µl. Se inició la reacción mediante la adición de 4 unidades de transcriptasa inversa (Gibco BRL; Gaithersburg, MD) y se incubó a 42°C durante 2 horas. Se terminó la reacción calentando y se congeló a -20°C.

- 45 Se añadieron 2 µl de esta reacción a cada tampón de reactivo PCR que contenía dNTP como se describen anteriormente en 100 µl que contenían 0,5 unidades de Taq polimerasa según las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim Biochemicals; Indianápolis, IN). Se cubrió la reacción con 50 µl de aceite mineral y se cicló en un termociclador a 94°C durante 1 minuto, 45°C durante 2 minutos y 72°C durante 2 minutos, repetidamente durante 40 ciclos. Se amplificó la región 3' no traducida del gen de ubiquitina de trigo (3' Ta ubiq) (SEQ ID NO:59) a partir de los productos de ADnC con las secuencias cebadoras SEQ ID NO. 15 y SEQ ID NO. 16. Se amplificó la región 3' no traducida del gen de choque térmico de trigo (3' Ta hsp17) (SEQ ID NO:58) como se describe anteriormente, usando las secuencias cebadoras SEQ ID NO. 17 y SEQ ID NO. 18. Se amplificó la región 3' no traducida de fructosa bisfosfatasa (3' Ta fbp) (SEQ ID NO:60) como se describe anteriormente, usando las secuencias cebadoras SEQ ID NO. 19 y SEQ ID NO. 20.
- 50

- 55 Se sometieron a electroforesis en gel de agarosa los productos de reacción amplificados y se analizó el tamaño. Se digirieron con EcoRI and BamHI los fragmentos de PCR correspondientes a 3' Ta ubiq (~225 pb), 3' Ta hsp (~240 pb) y 3' Ta fbp (~130 pb), se purificaron en gel con gel de agarosa al 1% y se aislaron usando Qiagen PCR prep según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Santa Clarita, CA). Se clonaron los fragmentos de PCR digeridos por el extremo en el fragmento de 6,5 kb digerido con EcoRI-BamHI del vector básico pMON19433 (Figura 5). Se

verificaron por secuenciación de ADN los transformantes resultantes con insertos de regiones 3' no traducidas de genes de trigo (Ta fbp, Ta hsp y Ta ubiq).

5 Se construyó el vector de expresión pMON32502 (Figura 6) mediante digestión de pMON26044 y pMON8375 con EcoRI y SmaI. Se ligó el fragmento 3' de Ta hsp de 0,24 kb de pMON18375 con el fragmento de cadena principal de vector de 6,0 kb de pMON26044, creando pMON32502. Se transformaron los productos de ligamiento en células DH5-alfa de *E. coli* mediante procedimientos estándares y se sembraron en placas de agar LB que contenían niveles selectivos de ampicilina (100 µg/ml).

10 Se construyó el vector de expresión pMON32506 (Figura 7) mediante digestión de pMON26055 (Figura 3) y pMON8375 con EcoRI y SmaI. Se ligó el fragmento 3' de Ta hsp de 0,24 kb de pMON18375 con el fragmento de cadena principal de vector de 5,9 kb de pMON26055 (Figura 3), creando pMON32506. Se transformaron los productos de ligamiento en células DH5-alfa mediante procedimientos estándares.

15 Se construyó el vector de expresión pMON32509 (Figura 8) mediante digestión de pMON26054 y pMON18377 con EcoRI y SmaI. Se ligó el fragmento 3' Ta ubiq de 0,23 kb de pMON18377 con el fragmento de cadena principal de vector de 5,9 kb de pMON26054 (Figura 4), creando pMON32509. Se transformaron los productos de ligamiento en células DH5-alfa de *E. coli* mediante procedimientos estándares.

Se construyó pMON32510 (Figura 9) mediante digestión de pMON26055 (Figura 3) y pMON18377 con EcoRI y SmaI. Se ligó el fragmento 3' Ta ubiq de 0,23 kb de pMON18377 con el fragmento de cadena principal de vector de 5,9 kb de pMON26055, creando pMON32510 (Figura 9). Se transformaron los productos de ligamiento en células DH5-alfa de *E. coli* mediante procedimientos estándares.

20 Se construyó pMON32513 (Figura 10) mediante digestión de pMON26054 y pMON18379 con NcoI y SmaI. Se ligó el fragmento de secuencia 3' GUS/Ta de 2,0 kb de pMON18379 con el fragmento de cadena principal de vector de 4,1 kb de pMON26054, creando pMON32513. Se transformaron los productos de ligamiento en células DH5-alfa de *E. coli* mediante procedimientos estándares.

25 Se construyeron los plásmidos pMON32515 (Figura 12), pMON32516 (Figura 13) y pMON32517 (Figura 14) digiriendo pMON32502, pMON32509 y pMON32513 con NcoI y EcoRI. En cada caso, se ligó entonces el fragmento de aproximadamente 4,3 kb con el fragmento NcoI de luciferasa de 1,8 kb creado mediante digestión parcial con EcoRI de pMON19437 (Figura 11). Se transformaron los productos de ligamiento de estos ligamientos en células DH5-alfa de *E. coli* mediante procedimientos estándares.

30 Se creó la secuencia líder 5' no traducida de beta-tubulina de arroz (5' r btub L) (nº de acceso a Genbank Accession L 19598.gb_pl) (SEQ ID NO:56) mediante fosforilación con cinasa (reacción que usa T4 polinucleótido cinasa para añadir fosfatos 5' para las posteriores etapas de ligamiento) y asociación (cocción seguida de enfriamiento suave) de las SEQ ID NO:21. SEQ ID NO:22. SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24. El extremo 5' del fragmento resultante tiene un extremo romo Pml I y el extremo 3' tiene un extremo cohesivo BgIII con fines de subclonación. Se ligó este fragmento con el fragmento PmlI-BgIII de 6,507 kb de pMON332100 (Figura 16), creando pMON33220 (Figura 17).

35 Se creó la secuencia líder 5' no traducida de un gen de peroxidasa de trigo (5' Ta per L) (número de acceso a Genbank X56011.gb_pl) (SEQ ID NO:55) mediante fosforilación con cinasa y asociación de las SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28. El extremo 5' del fragmento resultante tiene un extremo cohesivo BgIII seguido por un sitio de restricción XbaI, y el extremo 3' tiene un sitio BgIII seguido de un extremo cohesivo NcoI con fines de subclonación. Se ligó el fragmento con el fragmento BgIII-NcoI de 5,676 kb de pMON19469 (Figura 1), creando pMON26046.

Se creó la secuencia líder 5' no traducida de un gen de amilasa de arroz (nº de acceso a Genbank M24287.gb_pl) (5' r amy L) (SEQ ID NO:57) asociando las SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43 y SEQ ID NO:44 y fosforilando y ligando en el plásmido linealizado pMON33200, digerido con Pml I y Bgl II, creando pMON33219.

45 Se aisló el primer intrón del gen de amilasa de arroz (intrón r amyl) (nº de acceso a Genbank X16509.gb_pl) (SEQ ID NO:49) junto con 10 pares de bases de la secuencia exónica 5' y 3' flanqueante mediante PCR de ADN genómico de arroz (*Oryza sativa*), usando aproximadamente 1 µg de ADN. Se efectuó la amplificación usando las secuencias cebadoras SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:30. Se desnaturalizó el ADN durante 1 minuto a 95°C, se asoció durante 2 minutos a 50°C y se extendió durante 3 minutos a 72°C para un total de 30 ciclos. Se digirió el producto de PCR resultante con BgIII y XbaI y se ligó con el fragmento BgIII-XbaI de 5,687 kb de pMON33210 (Figura 16), creando pMON33211.

50 Se aisló el intrón de fenilalanina-amoniaco liasa de arroz (intrón r pal) (Zhu *et al.*, 1995) junto con 10 pares de bases de las secuencias exónicas 5' y 3' flanqueantes (SEQ ID NO:48) mediante PCR de ADN genómico de arroz. Se efectuó la amplificación usando las secuencias cebadoras SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:32. Se desnaturalizó el ADN durante 1 minuto a 95°C, se asoció durante 2 minutos a 50°C y se extendió durante 3 minutos a 72°C para un total de 30 ciclos. Se digirió el producto de PCR resultante con BgIII y XbaI y se ligó con el fragmento BgIII-XbaI de 5,687 kb de pMON33210 (Figura 16), creando pMON33226.

5 Se aisló el primer intrón del gen de sacarosa sintasa de arroz (intrón r ssl) (Wang *et al.*, 1992) junto con 10 pares de bases de las secuencias exónicas 5' y 3' flanqueantes (SEQ ID NO:51) mediante PCR de ADN genómico de arroz. Se efectuó la amplificación usando las secuencias cebadoras SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34. Se desnaturalizó el ADN durante 1 minuto a 95°C, se asoció durante 2 minutos a 50°C y se extendió durante 3 minutos a 72°C para un total de 30 ciclos. Se digirió el producto de PCR resultante con BglII y XbaI y se ligó con el fragmento BglII-XbaI de 5,687 kb de pMON33210 (Figura 16), creando pMON33228.

10 Se aisló la secuencia terminadora 3' no traducida de glutelina de arroz de tipo II (3' r glut) (nº de acceso a Genebank X05664.gb_p1) (SEQ ID NO:61) mediante PCR de ADN genómico de arroz. Se efectuó la amplificación usando las secuencias cebadoras SEQ ID NO:35 y SEQ ID NO:36. Se desnaturalizó el ADN durante 1 minuto a 95°C, se asoció durante 2 minutos a 50°C y se extendió durante 3 minutos a 72°C para un total de 30 ciclos. Se digirió el producto de PCR resultante con SphI y EcoRI. El pMON33225 contiene la región terminadora 3' no traducida r glut clonada con SphI/ EcoRI.

15 Se aisló la secuencia terminadora 3' no traducida de lactato deshidrogenasa de arroz (3' r lacd) (nº de acceso a Genebank D13817.gb_pl) (SEQ ID NO:62) mediante PCR de ADN genómico de arroz. Se efectuó la amplificación usando las secuencias cebadoras SEQ ID NO:37 y SEQ ID NO:38. Se desnaturalizó el ADN durante 1 minuto a 95°C, se asoció durante 2 minutos a 40°C y se extendió durante 3 minutos a 72°C para un total de 30 ciclos. Se digirió el producto de PCR resultante con SphI y EcoRI. El pMON33218 (Figura 15) contiene el fragmento SphI / EcoRI insertado.

20 Se aisló la secuencia terminadora 3' no traducida de beta-tubulina de arroz (3' r btub) (nº de acceso a Genebank L19598.gb_pl) (SEQ ID NO:63) mediante PCR de ADN genómico de arroz. Se efectuó la amplificación usando las secuencias cebadoras SEQ ID NO:39 y SEQ ID NO:40. Se desnaturalizó el ADN durante 1 minuto a 95°C, se asoció durante 2 minutos a 40°C y se extendió durante 3 minutos a 72°C para un total de 30 ciclos. Se digirió el producto de PCR resultante con SphI y EcoRI. El pMON33216 (Figura 13) contiene el fragmento SphI / EcoRI insertado.

25 Se construyó pMON47901 (Figura 19) ligando el fragmento EcoRI-PstI de 3,166 kb de pMON33225, el fragmento PstI-BglII de 0,71 kb de pMON26038 y el fragmento BglII-EcoRI de 2,671 kb de pMON 19433.

Se construyó pMON47906 (Figura 20) ligando el fragmento NcoI-BglII de 5,748 kb de pMON47909 y el fragmento StuI-NcoI de 0,449 kb de pMON33216 usando adaptadores en el sitio StuI que crean un extremo complementario de BglII (SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4).

30 Se construyó pMON47907 (Figura 21) ligando el fragmento NcoI-BglII de 5,743 kb de pMON4790 y el fragmento StuI-NcoI de 0,449 kb de pMON33216 usando adaptadores en el sitio StuI que crean un extremo complementario de BglII (SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4).

Se construyó pMON47915 (Figura 22) ligando el fragmento NcoI-BglII de 5,758 kb de pMON47918 y el fragmento StuI-NcoI de 0,449 kb de pMON33216 usando adaptadores en el sitio StuI que crean un extremo complementario de BglII (SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4).

35 Se construyó pMON47916 (Figura 23) ligando el fragmento NcoI-BglII de 5,753 kb de pMON47919 (Figura 26) y el fragmento StuI-NcoI de 0,449 kb de pMON33216 usando adaptadores en el sitio StuI que crean un extremo complementario de BglII (SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4).

40 Se construyó pMON47917 (Figura 24) ligando el fragmento NcoI-BglII de 5,895 kb de pMON47920 y el fragmento StuI-NcoI de 0,449 kb de pMON33216 usando adaptadores en el sitio StuI que crean un extremo complementario de BglII (SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4).

Se construyó pMON47919 (Figura 25) ligando el fragmento EcoRI-PstI de 3,166 kb de pMON33225, el fragmento PstI-BglII de 0,726 kb de pMON26046 y el fragmento BglII-EcoRI de 2,671 kb de pMON19433 (Figura 5).

45 Se verificaron todos los plásmidos mediante digestión por restricción con BglII y se ensayaron en ensayos de expresión transitoria en protoplastos derivados de callo Mustang de trigo o protoplastos derivados de callo BMS de maíz, o se ensayaron en forma de construcciones integradas establemente en plantas transgénicas como se describe a continuación.

Ejemplo 2

Transformaciones transitorias y expresión de gen informador en trigo y maíz

50 Se preparó ADN de plásmido purificado mediante el procedimiento Qiagen maxi prep según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA). Se mezclaron y electroporaron los plásmidos GUS que contenían secuencias líder 5' no traducidas o regiones terminadoras 3' no traducidas y combinaciones de regiones 5' y 3' no traducidas en ADN de vector y pMON19437 como control interno de luciferasa. Para experimentos inversos para examinar las potenciaciones con secuencias de codificación adicionales, la luciferasa era el gen informador variable, y GUS en pMON19469 era el control interno. Se efectuaron las transformaciones por duplicado. Se ensayaron también los

elementos de la región 3' no traducida en combinación con secuencias líder 5' no traducidas respecto al vector básico de control pMON19469.

Se ha documentado bien el análisis de expresión de genes en plantas (Schledzewski *et al.*, 1994; Steinbiss *et al.*, 1991; Stefanov *et al.*, 1991). El análisis de expresión en protoplasto tal como se describe aquí es a menudo predictivo del rendimiento de expresión de un gen recombinante en células de planta.

Análisis de la expresión génica en protoplastos de trigo

El procedimiento usado para el aislamiento y preparación de protoplastos de trigo se efectuó como se describe por Zhou *et al.*, 1993. El tampón de electroporación usado se ha descrito anteriormente (Li *et al.*, 1995). El medio de cultivo usado era MS1 WSM (4,4 g de sales MS de Gibco/l, 1,25 ml de tiamina-HCl (0,4 mg/ml), 1 ml de 2,4-D (1 mg/ml), sacarosa 20 g/l, 0,15 ml de asparagina (15 mg/ml), 0,75 g de MgCl₂, 109 g.l de manitol 0,6 M, pH 5,5.

Se usaron suspensiones de Mustang para el aislamiento de protoplastos aproximadamente 4 días después del subcultivo. Brevemente, se vertieron 8 g de suspensión celular de trigo en un tubo de cultivo y se dejaron asentar las células. Se retiró el medio y se resuspendieron las células restantes con 40 ml de solución enzimática, se transfirieron a una placa Petri, se envolvieron con lámina metalizada y se incubaron a 26°C durante 2 horas en un rotor a 40 rpm. Se centrifugó la suspensión a 200 g durante 8 min, se lavó dos veces con centrifugación entre cada lavado, se resuspendió en 10 ml de solución de lavado y se almacenó en hielo. Se determinó el número de protoplastos y se ajustó el volumen a una concentración final de 4x10⁶ protoplastos/ml. Se añadieron aproximadamente 0,75 ml de protoplastos a cada cubeta de electroporación y se añadieron a los protoplastos hasta aproximadamente 50 µg de ADN plasmídico en 50 µl de solución. Las condiciones de electroporación fueron 960 µF y 160 V usando un Bio-Rad Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las muestras permanecieron en hielo durante 10 minutos antes y durante la electroporación. Después de la electroporación, se dejaron las muestras en hielo durante aproximadamente 10 minutos y se retiraron entonces, dejando calentar a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. Se pipetearon entonces las células electroporadas en medio MS1 WSM y se incubaron en la oscuridad durante 18-22 horas a 24°C. Se recogieron las células mediante centrifugación a 200-250 g durante 8 min y se congelaron en hielo seco para el análisis posterior del gen o genes de interés.

Análisis de la expresión génica en protoplastos de maíz

Se usó un sistema de ensayo transitorio de protoplastos de maíz para evaluar la expresión de GUS/LUX de las diversas construcciones. Se efectuó el aislamiento y electroporación de los protoplastos de hoja de maíz como se describe por Sheen, 1991, con los siguientes cambios: se esterilizó la superficie de las semillas, se germinaron en medio 1/2MS (2,2 g/l de sales MS, 0,25% de gelrita) y se cultivaron durante 5 días a 26°C en un fotoperiodo de día/noche de 16/8 h, con 6 días de oscuridad completa a 26°C y 24 horas en las primeras condiciones de tratamiento. Se cortó longitudinalmente la segunda hoja verdadera de cada planta y se digirió durante aproximadamente 2 horas a la luz a 26°C. Después de la digestión, se agitaron las placas a 80-100 rpm durante 20-30 s y se pipeteó la solución de protoplastos/enzima a través de un colector de tejido de 190 µm. Se contaron los protoplastos usando un hemacitómetro. Se usaron cubetas Bio-Rad Gene pulser (Bio-Rad, Hercules, CA) con un espacio de 0,4 cm y un volumen máximo de 0,8 ml para las electroporaciones. Se añadieron a la cubeta 10 a 100 µg de ADN plasmídico, además de 5 µg de ADN que contiene el gen de luciferasa como control interno. Las densidades finales de protoplasto fueron de aproximadamente 3 millones por ml a 4,5 millones por ml, con los parámetros de electroporación a 125 µF de capacidad y 200 V. Se incubaron los protoplastos en hielo después de resuspensión en tampón de electroporación y se dejaron en hielo hasta 10 minutos después de la electroporación. Se añadieron los protoplastos a aproximadamente 7 ml de medio MS modificado como se describe por Fromm *et al.*, 1987, con la adición de manitol 0,6 M en placas Petri cubiertas con el mismo medio más agarosa SeqPlaque al 1,5% (FMC Bioproducts, Rockland, ME). Se recogieron los protoplastos mediante centrifugación 24 horas después de la electroporación y se usaron para el análisis de expresión posterior del gen o genes de interés.

Actividad GUS

Se determinó la actividad GUS (β-glucuronidasa) a partir de 25 µl de extracto celular según los procedimientos de Jefferson *et al.* (1987) usando MUG (β-D-glucurónido de 4-metilumbeliferilo) 2 mM en el tampón de extracción anteriormente descrito. Se midió la fluorescencia usando un fluorómetro Hoescht ADN (modelo TKO 100). Se generó una curva patrón de metilumbeliferona (Sigma) usando una solución 1 µM.

Actividad luciferasa

Para determinar la actividad luciferasa, se dispensaron 10 µl de cada extracto de proteína de ensayo bruta a una placa de microvaloración. Se añadieron 25 µl de tampón 2X (tricina 50 mM (pH 7,8), MgCl₂ 30 mM, ATP 10 mM y 0,5 mg/ml) a cada pocillo que contenía extracto. Se iniciaron las reacciones mediante la adición de 25 µl de luciferina 10 mM. Se mezclaron las muestras y se cuantificó la quimioluminiscencia de cada muestra en un contador de centelleo de microplaca TopoCount usando un retardo de recuento de 5 minutos y un tiempo de recuento de 0,2 minutos.

Los resultados se expresan como la relación de los niveles de genes informadores experimentales a los niveles de genes informadores de control. El plásmido de control contenía un gen informador diferente y se usó para corregir la variabilidad en los procedimientos de transformación y extracción.

5

TABLA 2. Efecto de las secuencias líder 5' no traducidas sobre la expresión de GUS en protoplastos Mustang de trigo

Vector	Secuencia líder 5' no traducida	Intrón	Secuencia terminadora 3' no traducida	Expresión relativa de GUS/LUX
pMON 19469	Sintética básica	hsp 70	nos	1,0
pMON25456	Sintética básica	Actina de arroz	nos	0,9
pMON26052	Ta hsp	hsp 70	nos	1,8
pMON26055	Ta hsp	Actina de arroz	nos	4,0
pMON26064	Ta fbp	Actina de arroz	nos	4,2
pMON26044	Ta cab	Actina de arroz	nos	6,7

Se midió el efecto de las secuencias líder 5' no traducidas sobre la expresión de GUS en protoplastos Mustang de trigo usando construcciones que contenían diversas secuencias líder 5' no traducidas. Se fijó como 1,0 el nivel de expresión del plásmido de control que contenía la secuencia 5' sintética básica (SEQ ID NO:45), el intrón hsp70 (SEQ ID NO:47) y la región terminadora 3' nos (SEQ ID NO:46). Se aumentó la expresión de GUS en los protoplastos de trigo cuando se usaron las secuencias líder 5' no traducidas de proteína de choque térmico de trigo (Ta hsp), fructosa 1,6-bisfosfatasa de trigo (Ta fbp) o proteína de unión a/b a clorofila de trigo (Ta cab), en comparación con las secuencias sintéticas básicas (Tabla 2). El efecto era menos pronunciado en protoplastos BMS de maíz (Tabla 3).

15 **TABLA 3. Efecto de las secuencias líder 5' no traducidas sobre la expresión de GUS en protoplastos BMS de maíz**

Vector	Secuencia líder	Intrón	Secuencia terminadora 3'	Expresión relativa de GUS/LUX
pMON 19469	Sintética básica	hsp 70	nos	1,0
pMON26052	Ta hsp	hsp 70	nos	0,8
pMON26055	Ta hsp	Actina de arroz	nos	4,9
pMON26064	Ta fbp	Actina de arroz	nos	0,7
pMON26044	Ta cab	Actina de arroz	nos	ND

La Tabla 4 muestra los resultados de GUS en protoplastos Mustang de trigo usando construcciones que contienen secuencias 3' no traducidas de proteína de choque térmico de trigo (3' Ta hsp), fructosa 1,6-bisfosfatasa de trigo (3' Ta fbp) o ubiquitina de trigo (3' Ta ubiq), en comparación con el vector que contiene la región nos 3'. Cada una de las regiones 3' no traducidas proporcionó una expresión de GUS aumentada respecto a la observada con la región 3' no traducida nos.

20

TABLA 4. Efecto de las regiones terminadoras 3' no traducidas sobre la expresión de GUS en hojas de trigo bombardeadas

Vector	Secuencia líder	Intrón	Secuencia terminadora 3'	Expresión relativa de GUS/LUX
pMON19433	Sintética básica	hsp 70	nos	1,0
pMON18379	Sintética básica	hsp 70	Ta fbp	1,9
pMON18375	Sintética básica	hsp 70	Ta hsp	2,8

(CONT)				
pMON18377	Sintética básica	hsp 70	Ta ubiq	2,6

- 5 Se evaluaron los efectos combinatorios de las secuencias 5' y 3' no traducidas dadas a conocer en protoplastos Mustang de trigo. Se midió la expresión de LUX además de la expresión de GUS para confirmar que los niveles de expresión aumentados no eran específicos de GUS. Aumentaron ambos niveles de expresión de GUS y LUX cuando se usaron las construcciones que contenían secuencias líder 5' no traducidas Ta cab, Ta hsp o Ta fbp y secuencias terminadoras 3' no traducidas Ta ubiq, Ta fbp o Ta hsp (Tabla 5).

TABLA 5. Efectos combinatorios de las secuencias terminadoras 5' y 3' no traducidas sobre la expresión de GUS y LUX en protoplastos Mustang de trigo

Vector	Secuencia líder	Intrón	Secuencia terminadora 3'	Expresión relativa de GUS/LUX	Expresión relativa de LUX/GUS
pMON19469	Sintética básica	hsp 70 de maíz	nos	1,0	-
pMON32502	Ta cab	act de arroz	Ta hsp	11,9	-
pMON32506	Ta hsp	act de arroz	Ta hsp	1,6	-
pMON32509	Ta fbp	act de arroz	Ta ubiq	8,5	-
pMON32510	Ta hsp	act de arroz	Ta ubiq	3,5	-
pMON32513	Ta fbp	act de arroz	Ta fbp	12,5	-
pMON19437	Sintética básica	hsp 70 de maíz	nos	-	1,0
pMON32516	Ta fbp	act de arroz	Ta ubiq	-	6,2
pMON32517	Ta fbp	act de arroz	Ta fbp	-	6,2
pMON32515	Ta cab	act de arroz	Ta hsp	-	7,6

- 10 Se midieron también los efectos combinados de las secuencias líder 5' no traducidas y secuencias terminadoras 3' no traducidas en protoplastos BMS de maíz. La expresión de GUS aumentaba generalmente por encima del control básico (Tabla 6). Los resultados observados en maíz corroboran los encontrados en trigo, demostrando que los efectos beneficiosos de las secuencias 5' y 3' no traducidas de la invención no están limitados a la especie de la que derivan las secuencias no traducidas.

15 **TABLA 6. Efectos combinatorios de secuencias terminadoras 5' y 3' no traducidas sobre la expresión de GUS en protoplastos BMS de maíz**

Vector	Secuencia líder	Intrón	Secuencia terminadora 3'	Expresión relativa de GUS/LUX
pMON19469	Sintética básica	hsp 70	nos	1,0
pMON32502	Ta cab	act de arroz	Ta hsp	5,0
pMON32506	Ta hsp	act de arroz	Ta hsp	5,8
pMON32509	Ta fbp	act de arroz	Ta ubiq	0,9
pMON32510	Ta hsp	act de arroz	Ta ubiq	2,5
pMON32513	Ta fbp	act de arroz	Ta fbp	1,2

EJEMPLO 3. Transformación estable en plantas de trigo

Se evaluaron también los efectos de las secuencias 5' y 3' no traducidas sobre la expresión de GUS en plantas de trigo transgénicas. El procedimiento de transformación y regeneración de trigo fue como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.631.152, pero se modificó para selección con G418. Brevemente, se cultivaron embriones inmaduros en medio CM4C durante 0-4 días (componentes de CM4C: sales MS de Gibco 4,3 g/l, vitaminas MS 10 ml/l (100X), 2,4-D 0,5 ml/l, maltosa 40 g/l, glutamina 0,5 g/l, cloruro de magnesio 0,75 g/l, hidrolizado de caseína 0,1 g/l, MES 1,95 g/l, Phytigel 2 g/l); se transfirieron los cultivos a medio CM4C Raff/mann durante aproximadamente 4 días, se bombardearon y se transfirieron a CM4C que contenía G418 25 mg/l durante aproximadamente 5 días; se regeneraron los cultivos en MMS0.2C que contenía G418 (25 mg/l) durante aproximadamente 19 días, se regeneraron en MMS0C que contenía G418 25 mg/l durante aproximadamente 33 días, se plantaron en MMS0C que contenía G418 25 mg/l durante aproximadamente 57 días y se transfirieron posteriormente a suelo aproximadamente a los 75 días. El medio CM4C (G418) contenía 2,2 ml/l de picloram 1 mg/ml, 1 ml/l de G418 (25 mg/ml) y 2 ml/l de ácido ascórbico (solución madre de 50 mg/ml). El CM4C Raff/Mann 0,25 contenía los siguientes componentes: sales MS 4,4 g/l, vitaminas MS 10 ml/l (100X), 2,4-D 0,5 ml/l, maltosa 40 g/l, rafinosa 74,3 g/l, manitol 22,78 g/l, glutamina 0,5 g/l, cloruro de magnesio 0,75 g/l, MES 1,95 g/l, hidrolizado de caseína 0,1 g/l, Phytigel 2 g/l, 2,2 ml de picloram (1 mg/ml) y 2 ml de ácido ascórbico (50 mg/ml). El medio MMS0.2C contenía sales MS 4,3 g/l, MES 1,95 g/l, 2 ml/l de vitaminas MMS, 0,2 ml/l de 2,4-D, maltosa 40 g/l y agar 2 g/l (Schweizer Hall). El MM20.2C (G418) contenía 1 ml de G418 25 mg/ml y 2 ml de ácido ascórbico 50 mg/ml. El MMS0C contenía sales MS 4,3 g/l, MES 1,95 g/l, vitaminas MMS 2,0 ml/l y maltosa 40 g/l. El MMS0C (G418) contenía 1 ml adicional de G418 25 mg/ml y 2 ml de ácido ascórbico 50 mg/ml. Se establecieron las líneas transgénicas usando las construcciones de ADN descritas en la Tabla 7 siguiente y se evaluaron en las plantas los niveles de actividad GUS.

Los niveles de GUS relativos eran comparables o mayores que con el vector control básico para muchas de las construcciones que contenían los elementos no traducidos de la invención. En particular, las construcciones que contenían una secuencia líder 5' no traducida Ta cab o Ta fbp usada en combinación con una secuencia terminadora 3' no traducida Ta hsp o Ta fbp proporcionaron los niveles mayores de expresión. Otra construcción preferida contenía una secuencia líder 5' no traducida Ta fbp y una región terminadora 3' no traducida nos.

TABLA 7 Efecto de los elementos genéticos líder 5' no traducidos y terminadores 3' no traducidos sobre la expresión estable de GUS en plantas de trigo transgénicas

Construcción	Secuencia líder / intrón / 3' no traducida	n	Actividad GUS media	Valor relativo medio	Actividad GUS intervalo bajo-alto	Valor relativo alto
pMON26044	Ta cab/act de arroz/nos	5	20,7 ± 28,1	0,7	0,6-72,7	1,0
pMON26052	Ta hsp/hsp 70/nos	9	11,1 ± 9,6	0,4	0,7-26,3	0,4
pMON26055	Ta hsp/act de arroz/nos	4	15,3 ± 24,1	0,6	0,6-57,0	0,8
pMON26064	Ta fbp/act de arroz/nos	4	72,1 ± 102,3	2,6	1,0-248,6	3,5
pMON32502	Ta cab/act de arroz/Ta hsp	55	82,8 ± 135,6	3,0	0,6-779,8	11,0
pMON32509	Ta tbp/act de arroz/Ta ubiq	6	25,6 ± 24,0	0,9	1,7-71,2	1,0
pMON32513	Ta fbp/act de arroz/Ta fbp	10	86,1 ± 62,3	3,1	17,0-244,8	3,4
Todos los valores de actividad GUS expresados como pmol/min/mg de proteína						
n- número de plantas de trigo independientes ensayadas						

Se usó el porcentaje de eventos positivos de GUS en plantas de trigo transgénicas para determinar el efecto de las secuencias líder 5' no traducidas y terminadoras 3' no traducidas sobre la recuperación de la expresión de GUS estable. Las construcciones que proporcionaron altos niveles de expresión de GUS en la Tabla 7 causaron también un alto porcentaje de eventos positivos de GUS (Tabla 8).

TABLA 8. Efecto de los elementos genéticos líder 5' no traducidos y terminadores 3' no traducidos sobre la recuperación de la expresión estable de GUS por encima de los niveles umbral de fondo en plantas de trigo transgénicas

Construcción	Secuencia líder / intrón / 3' no traducida	Número de plantas	Número de eventos	Eventos positivos de GUS	% de eventos positivos de GUS
pMON19468	básica/hsp 70/nos	29	14	2	14
pMON26044	Ta cab/act de arroz /nos	17	11	4	36
pMON26052	Ta hsp/hsp 70/nos	31	22	5	23
pMON26055	Ta hsp/act de arroz/nos	20	15	4	27
pMON26064	Ta fbp/act de arroz/nos	9	8	4	50
pMON32502	Ta cab/act de arroz/Ta hsp	122	58	33	57
pMON32509	Ta fbp/act de arroz/Ta ubiq	20	15	4	27
pMON32513	Ta fbp/act d arroz/Ta fbp	44	37	16	43

5 **TABLA 9. Efecto de las secuencias líder 5' no traducidas sobre la expresión de GUS en protoplastos de hoja de maíz**

Construcción	Secuencia líder 5'	Intrón	Secuencia terminadora 3'	GUS/LUX relativo
pMON8677	Sintética básica	ninguno	nos	1,0
pMON26038	Ta cab	ninguno	nos	12,7
pMON26043	Ta hsp	ninguno	nos	7,1
pMON26046	Ta hsp	ninguno	nos	6,2
pMON33219	r amyl	ninguno	nos	1,7

TABLA 10. Efecto de las secuencias líder 5' no traducidas sobre la expresión de GUS en protoplastos de hoja de maíz

Construcción	Secuencia líder 5' no traducida	Intrón	Secuencia terminadora 3' no traducida	Expresión relativa de GUS/LUX
pMON33210	Sintética básica	hsp 70	nos	1,0
pMON33220	r btub	hsp 70	nos	1,5

10 Se midió el efecto de diversas secuencias líder 5' no traducidas sobre la expresión de GUS en protoplastos de hoja de maíz usando construcciones que contenían diversas secuencias líder 5' no traducidas (Tablas 9 y 10). La expresión de GUS aumentó en protoplastos de hoja de maíz cuando se usaron secuencias líder 5' no traducidas de proteína de unión a/b a clorofila de trigo (Ta cab), proteína de choque térmico de trigo (Ta hsp), peroxidasa de trigo (Ta per) o beta-tubulina de arroz (r btub).

15

TABLA 11. Efecto de los intrones sobre la expresión de GUS en protoplastos de hoja de maíz

Construcción	Secuencia líder 5' no traducida	Intrón	Secuencia terminadora 3' no traducida	Expresión relativa de GUS/LUX
pMON8677	Sintética básica	ninguno	nos	1,0
pMON33211	Sintética básica	r amyl	nos	5,6
pMON3226	Sintética básica	r pal	nos	2,5
pMON3228	Sintética básica	r ssl	nos	2,3

- 5 Se midió el efecto de diversos intrones sobre la expresión de GUS en protoplastos de hoja de maíz usando construcciones que contenían diversos intrones. La expresión de GUS aumentó en protoplastos de hoja de maíz cuando se usaron los primeros intrones de arroz de amilasa (r amyl), fenilalanina-amoniaco liasa (r pal) o sacarosa sintasa (ssl).

TABLA 12. Efecto de las regiones terminadoras 3' no traducidas sobre la expresión de GUS en protoplastos de hoja de maíz

Construcción	Secuencia líder 5' no traducida	Intrón	Secuencia terminadora 3' no traducida	Expresión relativa de GUS/LUX
pMON26044	Ta cab	Actina de arroz	nos	1,0
pMON33225	Ta cab	Actina de arroz	r glut	4,0
pMON33218	Ta cab	Actina de arroz	r lacd	4,5
pMON33216	Ta cab	Actina de arroz	r btub	3,6

- 10 Se midió el efecto de diversas secuencias terminadoras 3' no traducidas sobre la expresión de GUS en protoplastos de hoja de maíz usando construcciones que contenían diversas secuencias terminadoras 3' no traducidas. La expresión de GUS aumentó en protoplastos de hoja de maíz usando las secuencias terminadoras 3' no traducidas de glutelina de arroz de tipo II (r glut), lactato deshidrogenasa de arroz (r lacd) o beta-tubulina de arroz (r btub), en comparación con la construcción de control que contenía la secuencia terminadora 3' no traducida nos.

TABLA 13. Efectos combinatorios de secuencias 5' y 3' no traducidas sobre la expresión de GUS en protoplastos de hoja de maíz

Construcción	Secuencia líder 5'	Intrón	Secuencia terminadora 3' no traducida	Expresión relativa de GUS/LUX
pMON19469	Sintética básica	hsp 70	nos	1,0
pMON33218	Ta cab	Actina de arroz	r lacd	2,8
pMON33225	Ta cab	Actina de arroz	r glut	3,1
pMON47901	Ta cab	Actina de arroz	r glut	2,7
pMON47906	Ta hsp	Actina de arroz	r lacd	3,2
pMON47907	Ta hsp	Actina de arroz	r glut	3,5
pMON47915	Ta per	Actina de arroz	r lacd	3,4
pMON47916	Ta per	Actina de arroz	r glut	3,9

(CONT)				
pMON47919	Ta per	hsp 70	r btub	3,2
pMON47917	Ta per	Actina de arroz	r btub	2,4
pMON32502	Ta cab	Actina de arroz	Ta hsp	3,0

TABLA 14. Efectos de diversas secuencias líder sobre la expresión de GUS en protoplastos de hoja de maíz

Construcción	Secuencia líder 5'	Intrón	Secuencia líder 3' no traducida	Expresión relativa de GUS/LUX
pMON8677	Ninguna	hsp 70	nos	1,0
pMON33219	r amyl	hsp 70	nos	1,65
pMON26038	Ta cab	ninguno	nos	12,74
pMON26043	Ta hsp	ninguno	nos	7,11
pMON26046	Ta per	ninguno	nos	6,16
pMON33210	ninguna	hsp 70	nos	1,0

El nivel de potenciación de la expresión para ADN estructurales puede variar debido a razones distintas que las secuencias líder 5' no traducidas, las secuencias terminadoras 3' no traducidas o las secuencias intrónicas. Estas razones pueden incluir sitios de procesamiento transcripcional, sitios de poliadenilación, señales de terminación transcripcional, señales de transporte en la región de codificación etc. La misma secuencia puede proporcionar niveles de expresión variables dependiendo de la especie en que se esté expresando y de la composición exacta de la secuencia, y puede requerirse cierto grado de optimización rutinaria para unos mejores resultados en diferentes especies de planta.

10 **Referencias**

- Bird y Ray, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 9: 207-27 (1991)
- Birren *et al.*, "Genome Analysis: Analyzing ADN", 1, *Cold Spring Harbor, Nueva York* (1996)
- Bouhida *et al.*, *Journal General Virology* (1993) vol. 74 pág. 15-22.
- Callis *et al.*, *Genes and Develop.* I: 1183-1200 (1987)
- 15 Carrington y Freed, *J. of Vir.* 64, 1590-1597 (1990)
- Coruzzi *et al.* *EMBO J.* (1984) vol. 3, pág. 1671-1679.
- Dellaporta *et al.*, *Stadler Symposium* 11: 263-282 (1988)
- Dietrich *et al.*, *J. Cell Biol.* 105, 67, (1987)
- Fromm *et al.* *Methods Enzymol.* 153, 351-366 (1987)
- 20 Gallie *et al.*, *NAR* 15, 8693-871 (1987)
- Gallie *et al.*, *The Plant Cell* 1: 301-311 (1989)
- Gelvin *et al.*, en: "Plant Molecular Biology Manual", Kluwer Academic Publishers (1990)
- Gibson y Shillitoe, *Molecular Biotech.* 7(2) 125-37 (1997)
- Goff *et al.*, *EMBO J.* 9: 2517-2522 (1990)
- 25 Hattori *et al.*, *Genes Dev.* 6: 609-618 (1992)
- Hinchee *et al.*, *Bio/Technology* 6: 915-922 (1988)

- Hinchee *et al.*, "Plant Transformation", en "PLANT CELL AND TISSUE CULTURE", 231-270, 1994, Vasil and Thorpe (Eds.), Dordrecht Publishing, Holanda.
- Ikatu *et al.*, Bio/Technol. 8: 241-242 (1990)
- Innes *et al.*, en: "PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, 1990
- 5 Jackson *et al.*, TIBS 15, 477-483 (1990)
- Jefferson *et al.*, EMBO J. 6: 3901-3907 (1987)
- Jefferson, Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405 (1987)
- Jobling y Gehrke, Nature 325, 622-625 (1987)
- Jorgensen, Trends in Biotech. 8(12) 340-44 (1990)
- 10 Joshi, Nucl. Acids Res 15: 6643-6653, 1987
- Katz *et al.*, J. Gen. Microbiol. 129: 2703-2714 (1983)
- Klein *et al.*, Bio/Technology 6: 559-563
- Kozak. Cell 44, 283-292 (1996)
- Kozak, Mol. and Cell. Biol. 8, 2737-2744 (1988)
- 15 Koziel *et al.*, Plant Mol. Biol. 32: 393-405 (1996)
- Li *et al.* Molecular Breeding (1997) vol. 3, pág. 1-14.
- Mailga *et al.*, "Methods in Plant Molecular Biology", Cold Spring Harbor Press (1995)
- Marcotte, *et al.*, Nature, 335: 454-457 (1988)
- Marcotte, *et al.*, Plant Cell, 1: 523-532 (1989)
- 20 Mascarenkas *et al.*, Plant Mol. Biol., 15, 913-920 (1990)
- McCarty, *et al.*, Cell 66: 895-905 (1991)
- McElroy *et al.*, Plant Cell. 2: 163-71 (1990)
- McElroy *et al.*, Mol. Gen. Genet. 231: 150-160 (1991)
- Medberry y Olszewski, Plant Journal (1993) vol. 3, pág. 619-626.
- 25 Moffatt *et al.* Gene (1994) vol. 143, pág. 211-216.
- Moldave, Ann. Rev. Biochem. 54, 1109-1149 (1985)
- Ni *et al.* Plant J. (1995) vol. 7, pág. 661-676.
- Odell *et al.* Nature (1985) vol. 313, pág. 810-812.
- Ow *et al.*, Science 234: 856-859 (1986)
- 30 Pain, Biochem. J. 235, 625-637 (1986)
- Pelletier y Sonenberg, Cell 40, 515-526 (1985)
- Potrykus *et al.*, Mol. Gen. Genet. 199: 183-188 (1985)
- Pouwels *et al.*, en "Cloning Vectors. A Laboratory Manual", 1985, sup., 1987
- Ritchie *et al.*, en "TRANSGENIC PLANTS", Vol. 1, 147-177, 1993, Kung and Wu (Eds.), Academic Press Inc, Harcourt Brace Jovanovich Publishers.
- 35 Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press (1989)
- Sanger *et al.* Plant Mol. Biol. (1990) vol. 14, pág. 433-443

- Schledzewski *et al.*, Transgenic Research (1994) 3: 249-255
- Schuch, Symposia of the Society for Experimental Biology 45: 117-27 (1991)
- Sheen *et al.* Plant Cell 3(3) 225-245 (1991)
- Skuzeski *et al.*, Plant Mol. Biol. 15. 65-79 (1990)
- 5 Sonenberg, Curr. Top. Micro. and Imm. 161, 23-47 (1990)
- Songstad *et al.*, In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 32: 179-183 (1995)
- Stalker *et al.*, J. Biol. Chem. 263: 6310-6314 (1988)
- Stefanov *et al.*, Acta Biologica Hungarica (1991) 42: 323-330
- Steinbiss *et al.*, Subcellular Biochem. (1991) 17: 143-166
- 10 Sutcliffe *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 75: 3737-3741 (1978)
- Tanaka, Nucl. Acids Res. 18: 6767-6770, 1990
- Thillet *et al.*, J. Biol. Chem. 263: 12500-12508 (1988)
- Vasil *et al.*, Bio/Technology 10: 667, (1992)
- Wang *et al.*, Plant Mol. Biol., 19: 881-885 (1992)
- 15 Weissbach y Weisbach, en "Methods for Plant Molecular Biology", Academic Press. 1989
- Wen *et al.* Chinese J. of Bot. (1993) vol. 5, pág. 102-109
- Xu *et al.* Plant Physiology (1994) vol. 106, pág. 459-467
- Zhong *et al.* Plant Science (1996) vol. 116, pág. 73-84
- Zhou. H. *et al.*, Plant Cell Reports (1993) 12: 612-616
- 20 Zhu *et al.*, Plant Mol. Biol. 29: 535-550 (1995)
- Zukowsky *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 80: 1101-1105 (1983)

Lista de secuencias

- <110> Conner, Timothy W Santino. Colleen G
- <120> Vectores de expresión de plantas novedosos
- 25 <130> Elementos monocotiledóneos
- <140>
- <141>
- <150> 60/097150
- <151> 10-08-1998
- 30 <160> 63
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
- <211> 36
- <212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 1

gatggatcct ctagaacct ctccacaca ctcaag 36

<210> 2

<211> 34

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 2

10 gatccatggc gcagatcta tgggtgttg tccc 34

<210> 3

<211> 13

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 3

gatccaaggg agg 13

<210> 4

20 <211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

25 <400> 4

cctcccttg 9

<210> 5

<211> 48

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 5

gatcctctag agaattccct ttctctacct acgatccgat accgaatt 48

35 <210> 6

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 6

tccgagcgc acaagccaaa ccaaagcaag atctgac 37

<210> 7

<211> 35

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 7

15 **tccgatcgtg gtaggaaaa gggaattctc tagag** 35

<210> 8

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 8

catggtcaga tcttgcttg gttggcttg tgcgctcgga aaattcgta 50

<210> 9

25 <211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

30 <400> 9

gatcctctag agggccacca ccacggtgcg cgccaagaca aggcagggg 49

<210> 10

<211> 31

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 10

agagaaattc gtcaatccgc agcagatctg c 31

5 <210> 11

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 11

gtcttggcgc gcaccgtggt ggtggccctc tagag 35

<210> 12

<211> 45

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 12

20 catggcagat ctgctgogga ttgacgaatt tctctccct gcctt 45

<210> 13

<211> 12

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 13

gatctacggg gt 12

<210> 14

30 <211> 12

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

35 <400> 14

ctagaccccg ta 12

<210> 15

<211> 31

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 15

aggaattcgc tctggccat ggagctgctt c 31

10 <210> 16

<211> 55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 16

agggatccaa aaaacacaca cagatctccg ctcaactatt catagttcac caaag 55

<210> 17

<211> 31

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 17

25 aggaattctg catgctgttg gacgatgct c 31

<210> 18

<211> 56

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 18

agggatccaa aaaacacaca cagatctaatt tctttttt ttgcactcaa aatcag 56

<210> 19

35 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 19

5 **aggaattcaa caagaacgag ggagggatac ac** 32

<210> 20
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 20

agggatccaa aaaacacaca cagatctott gacctcaca tccaattgga attc 54

<210> 21

15 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

20 <400> 21

gtgtccacc acccctgat ctctgctcg cggc 35

<210> 22
 <211> 43
 <212> ADN

25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 22

gccgatcgga tcgctgggtt ggatcatcac aactcggcaa aga 43

30 <210> 23
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 23
cgatcggcgg cggcgagcga gagatcgagg ggtgggtgga cac 43

<210> 24
 <211> 38
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 24

10 **gatctctttg ccgagtttg atgatccacc acgcgatc** 38
 <210> 25
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 25

gatcctctag aaccaccaca ccactccacc agtaagaagt gcagcaggta gctagt 56
 <210> 26
 20 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 25 <400> 26

aagccggcgt agctttgctc ttgcagctag agatctaac 39
 <210> 27
 <211> 42
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 27

tgctgcactt cttactggtg gagtgggtg gtggttctag ag 42
 35 <210> 28

- <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 28
catggttaga tctctagctg caagagcaaa gctacgccgg cttagct acc 53
 <210> 29
 <211> 32
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 29
 15 **tagtagagat ctctgttcc aggtaagaga tc 32**
 <210> 30
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 30
tagtagtcta gaagttgaat ccctgcatca tc 32
 <210> 31
 25 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 30 <400> 31
tagtagagat ctgagctcat caggtagg 29
 <210> 32
 <211> 32
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 32
 tagtagtcta gaccgggatt gaggaatctg cc 32
 <210> 33
 5 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 10 <400> 33
 tagtagagat ctccaccatt gggtagttg c 31
 <210> 34
 <211> 35
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 34
 tagtagtcta gaatttcagg aactgcaaag aaagg 35
 20 <210> 35
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 35
 tagtaggaat tcgttgcaa tgcggataaa g 31
 <210> 36
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 36
 35 tagtaggcat gcccataaga taagggaggg ttg 33

<210> 37
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 37
tagtaggaat tctaaatctt attattatc 29
 <210> 38
 10 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 15 <400> 38
tagtaggcat gctcgacaat aagtactgt c 31
 <210> 39
 <211> 31
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 39
tagtaggaat tcggtggctt ttgcttggtg g 31
 25 <210> 40
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 40
tagtaggcat gcaagatcca tatgcctata g 31
 <210> 41
 <211> 40
 35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 41

5 **gtgatccatc atctacaaga gatcgatcag tagtggtag** 40

<210> 42
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 42

gttgctgcta accactactg atcgatctct tgtagatgat ggatcac 47

<210> 43

15 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

20 <400> 43

cagcaactca ctatogaaca cggtttcagc ttacacagat a 41

<210> 44
 <211> 38
 <212> ADN

25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 44

gatctatctg tgtaagctga aaccgtgttc gatagtga 38

30 <210> 45
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 45

cacgctgaca agctgactct agcagatct 29

- <210> 46
- <211> 253
- <212> ADN

5 <213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 46

gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctttgcg 60
atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
atgacgttat ttatgagatg ggTTTTatg attagagtcg cgcaattata catttaatac 180
gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat ttcgcgcgcg ggtgtcatct 240
atgttactag atc 253

- <210> 47
- <211> 804

10 <212> ADN

<213> *Zea mays*

<400> 47

accgtcttcg gtacgcgctc actccgccct ctgcctttgt tactgccacg ttctctgaa 60
tgctctcttg tgtggtgatt gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa 120
atcgtgttct gcctgtgctg attacttgcc gtcctttgta gcagcaaaat atagggacat 180
ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttgggtgct 240
tagcgggtatt tatttaagca catgttggtg ttatagggca cttggattca gaagtttgc 300
gtaatttag gcacaggctt catactacat gggTcaatag tatagggatt catattatag 360
gcgatactat aataatttgt tcgtctgcag agcttattat ttgccaaaat tagatattcc 420
tattctgttt ttgtttgtgt gctgttaaT tgtaacgcc tgaaggaata aatataaatg 480
acgaaatTt gatgtttatc tctgctcctt tattgtgacc ataagtcaag atcagatgca 540
cttgttttaa atattgttgt ctgaagaaat aagtactgac agtattttga tgcattgac 600
tgcttgtttg ttgtaacaaa atttaaaaat aaagagtttc cttttgttg ctctccttac 660
ctcctgatgg tatctagtat ctaccaactg acactatatt gcttctctt acatacgtat 720
cttgcctgat gccttctccc tagtgttgac cagtgttact cacatagtct ttgetcatt 780
cattgtaatg cagataccaa gcgg 804

- <210> 48
- <211> 149
- <212> ADN

15 <213> *Oryza sativa*

<400> 48

gatctgagct catcaggtga ggattaggat tccaaataag cgataacgtt tacctggta 60
ctgcgattag ttcagtttac tgtgaaatc ttggaccct tcttaattat aaatttgctt 120
gtttctcgg cagattcctc aatgccggt 149

- <210> 49
- <211> 128
- <212> ADN

5 <213> *Oryza sativa*
 <400> 49

gatctcctgt ttcaggttaag agatcgccat gagttgggtt tcaggcttca gtgaactgat 60
cgggtttgt actgagccta agagaatgat gcagtgatgc tcttgtgtt gatgatgatg 120
cagggatt 128

- <210> 50
- <211> 491

10 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 50

cctccgccgc cgccggtaac cacccegcc cctctctctt tcttctcgc tttttttc 60
cgctcgggc tcgatcttg gccctgtag ttgggtggg cgagaggcgg ctctgtgcgc 120
gcccagatcg gtgcgcgga ggggcgggat ctcgcgctg gggctctgc cggcgtggat 180

ccggcccga tctcggggg aatggggctc tcggatgtag atctgcgac cgccgttgtt 240
gggggagatg atggggggtt taaaattcc gccgtgctaa acaagatcag gaagagggga 300
aaagggcact atggtttata ttttatata ttctgctgc ttcgtcagge ttagatgtgc 360
tagatcttc tttctctt ttgtggtag aattgaatc cctcagcatt gtcatcggg 420
agttttctt tcatgatt gtgacaaatg cagcctcgtg cggagcttt ttgtaggtag 480
aagtgatcaa c 491

- <210> 51
- <211> 1186
- <212> ADN

15 <213> *Oryza sativa*
 <400> 51

ccaccattgg gtatgttget tccattgcca aactgttccc tttacccat aggtgattg 60
 atcttggtg tgtgatttt tgcctgggtt ttgagctga ttcagcggcg ctgcagcct 120
 cttgatcgtg gtcttggtc gccatttct tgcattctt tgggggtcg tcagctgaat 180
 cttgcaggag ttttgctga catgttctg ggtttactgc ttcggtaaa tctgaaccaa 240
 gaggggggtt tctgctgag tttagtgggt ttactatgag cggattcggg gtttcgagga 300
 aaaccggcaa aaaacctcaa atcctcgacc tttagtttg ctgccacgtt gctccgcccc 360
 attgcagagt tcttttgc cccaaattt ttttacttg gtgcagtaag aatcgcgct 420
 cagtgattt ctgactcgt agtccgtga tactgtgtct tgcctatcac ttgttctgct 480
 taatctttt tgcctcctga ggaatgtctt ggtgcctgc ggtggatggc gaacaaaaa 540
 tgaaggggtt tttttttg aactgagaaa aatctttggg ttttggtg gattcttca 600
 tggagtcgcg acctccgta ttcttctt tgatctccc gcttgcggat tcataatatt 660
 cggaactca tgttggtct gcttaatct tagccaaatc ttcatctc cagggatctt 720
 tcgctctgc ctatcggatt taggaattag gatctaactg gtgctaatac taaagggtaa 780
 tttggaacca tgcattata atttgcaaa gttgagata tgcctcgggt atctcaatga 840
 tactactaa aaccaacaa atccattga taaagctggt tctttatcc cttgaaaac 900
 attgtcagag tatattggt caggttgatt tatttgaat cagtactgc actctgctc 960
 gtaaaccata gatgcttca gttgtgtaga tgaacagct gttttagtt atgtttgat 1020
 cttccaatgc tttgtgiga tgtattagt gttgattag catggcttc ctgttcagag 1080
 atagtctgc aatgcttagt gatggctgt gactaattat tcttgcaaa gtgagtgtt 1140
 ttgtacgtg ttgctaagt taaccttct ttgcagtcc tgaat 1186

- <210> 52
- <211> 71
- <212> ADN
- 5 <213> *Triticum aestivum*
- <400> 52

gatcctctag aaccatctc cacacactca agccacacta ttggagaaca cacagggaca 60
acacaccata a 71

- <210> 53
- <211> 66
- 10 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
- <400> 53

gaattccctt ttctaccta c gatccgata ccgaatttc cgagcgcaca agccaaacca 60
aagcaa 66

- 15 <210> 54
- <211> 68

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

5 <400> 54

tctagagggc caccaccag gtgcgcgcca agacaaggca ggggagagaa attcgtcaat 60
ccgcagca 68

<210> 55

<211> 82

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 55

tctagaacca ccacaccact ccaccagtaa gaagtgcagc aggtagctag taagccggcg 60
tagctttgct cttgcagcta ga 82

15 <210> 56

<211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 56

tccaccacc cctcgatctc tcgctcgccg ccgccgatcg gatcgcgtagg ttggatcacc 60
acaactcggc 70

<210> 57

<211> 74

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 57

atccatcacc tacaagagat cgatcagtag tggtagcag caactcacta tcgaacacgg 60
tttcagctta caca 74

30 <210> 58

<210> 58

<211> 234

<212> ADN

<213> *Triticum aestivum*

<400> 58

aattctgcat gcgtttgac gtatgctcat tcaggttga gccattgg ttgatgtg 60
tgcgagttct tgcgagtctg atgagacatc tctgtattgt gttcttcc ccagtgttt 120
ctgtacttgt gtaatcggct aatcgccaac agattcggcg atgaataaat gagaaataa 180
ttgtctgat ttgagtgc aaaaaaagg aattagatct gtgtgtgtt ttg 234

5

<210> 59

<211> 231

<212> ADN

<213> *Triticum aestivum*

10 <400> 59

aattcgtcc tggccatgga gctgctctg tctctgggtt cacaagtctc ggtgtctccg 60
gtatctcca atggagtctg gtctgtgtct gtcgttccct gactgtctt gttctgtac 120
catactgiga tgcagtgtta tcgtttgat ctcaaactt ctgctgggtg ggagcagctt 180
tggtgaacta tgaataagt agcggagatc tgtgtgtgt ttttggatc c 231

<210> 60

<211> 131

<212> ADN

15 <213> *Triticum aestivum*

<400> 60

aattcaaca gaacgagga gggatacaca ggctgttct tccaagaaat tattgtaact 60
aatatataat gtagccctt tctgtgatg cggaaaatat attgaagaa ttccaattg 120
attgtgaggt c 131

<210> 61

<211> 236

20 <212> ADN

<213> *Oryza sativa*

<400> 61

ctaagttggc aatgcggata aagaataact aaataataa ataaataat tgcaagcaat 60
tgcgttgctg ctatgtactg taaaagtctt ttataatac agttctgaat gctaaggaca 120
tcctcaaga tggctttct attttgtgt tccgttcca atgtactgtt cgtatctct 180

tggagattca tcaatatgag aaaacagaga atggacaacc ctcccttctc ttatgg 236

<210> 62
 <211> 241
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

5 <400> 62

ttctaaatct tattattatc atcgtcgtcg tcgtctcgtc acggaattaa ttaaagtacc 60
tactccgtac ttagctagct acaataataa ggattcattg atcactacaa gagtgatega 120
ctcgcactgta gtatgtgtgt gcaatataat gtgctgtcta tcaacaacta ctagtattgt 180
cattttttc gaaccaggga acttttaat gataagaaga aaaagacaag tacttattgt 240
c 241

<210> 63
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

10 <400> 63

attcggtagc tttgcttgg tggttctagg gcagggttt gtgtgcttgg tgtttccgtc 60
ttacattac accgtattac cgcctcgtac gccaccgccg gtcctatgt ctccgctttg 120
tttttcgtc tgtgctatgg gaacctttt gggtagctga ttactgatg ctggctcgcg 180
attgtgata tttcgggatg aattttacct ttccgcgtg gtccctcgtg gtaatattg 240
caaattacgg aactaggaag gtagcccgcg cattcgcgtg ggcatgtatc gtaggctgta 300
ttgagataa tcgtaagtaa taggctgatt gtgttaaaat gttgcattg ttatatagta 360
aactataggc atatgatct t 381

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN recombinante que comprende, ligadas operativamente en dirección 5' a 3':
 - (a) una secuencia promotora;
 - (b) una secuencia líder 5' no traducida que comprende la SEQ ID NO:52;
 - 5 (c) una primera secuencia intrónica aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen seleccionado del grupo constituido por un gen de actina de arroz, un gen de sacarosa sintasa de arroz, un gen de fenilalanina-amoniaco liasa de arroz y un gen de proteína de choque térmico de maíz;
 - (d) una secuencia de codificación de ADN y
 - 10 (e) una secuencia terminadora 3' no traducida aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen de la proteína de choque térmico de trigo, un gen de ubiquitina de trigo, un gen de fructosa 1,6-bisfosfatasa de trigo, un gen de glutelina de arroz, un gen de lactato deshidrogenasa de arroz y un gen de beta-tubulina de arroz.
2. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la primera secuencia intrónica es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de actina de arroz.
- 15 3. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la primera secuencia intrónica es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de sacarosa sintasa de arroz.
4. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la primera secuencia intrónica es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de fenilalanina-amoniaco liasa de arroz.
5. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la primera secuencia intrónica es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de amilasa de arroz.
- 20 6. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la secuencia terminadora 3' no traducida es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de glutelina de arroz.
7. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la secuencia terminadora 3' no traducida es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de lactato deshidrogenasa de arroz.
- 25 8. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la secuencia terminadora 3' no traducida es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de beta-tubulina de arroz.
9. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la secuencia terminadora 3' no traducida es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de proteína de choque térmico de trigo.
10. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la secuencia terminadora 3' no traducida es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de ubiquitina de trigo.
- 30 11. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la secuencia terminadora 3' no traducida es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de fructosa 1,6-bisfosfatasa de trigo.
12. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la primera secuencia intrónica es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de actina de arroz y la secuencia terminadora 3' no traducida se aísla a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de proteína de choque térmico de trigo.
- 35 13. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la primera secuencia intrónica es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de actina de arroz y la secuencia terminadora 3' no traducida se aísla a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de fructosa 1,6-bisfosfatasa de trigo.
14. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que el promotor es constitutivo, inducible, regulado por el desarrollo, regulado químicamente, potenciado por tejido o específico de tejido.
- 40 15. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la secuencia de codificación de ADN está en la orientación codificante.
16. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la secuencia de codificación de ADN está en la orientación anticodificante.
- 45 17. Una célula transformada que comprende una molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1.

18. La célula transformada de la reivindicación 17, en la que la célula es una célula de planta o bacteria.
19. La célula transformada de la reivindicación 17, en la que la célula es una célula de planta.
20. Una planta que comprende la célula de planta de la reivindicación 19.
21. La planta de la reivindicación 20, en la que la planta es una monocotiledónea.
- 5 22. La planta de la reivindicación 20, en la que la planta se selecciona de cebada, avena, maíz, arroz, centeno y trigo.
23. La planta de la reivindicación 21, en la que la planta es una planta de trigo.
24. La planta de la reivindicación 21, en la que la planta es una planta de maíz.
- 10 25. Un procedimiento para proporcionar una expresión génica potenciada a plantas monocotiledóneas que comprende:
- (a) transformar células de plantas monocotiledóneas con una molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1;
- (b) seleccionar células de planta que se hayan transformado y
- (c) regenerar las células de planta seleccionadas, proporcionando una planta diferenciada.
- 15 26. El procedimiento de la reivindicación 25, en la que la primera secuencia intrónica es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de actina de arroz.
27. El procedimiento de la reivindicación 25, en la que la primera secuencia intrónica es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de sacarosa sintasa de arroz.
- 20 28. El procedimiento de la reivindicación 25, en la que la primera secuencia intrónica es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de fenilalanina-amoniaco liasa de arroz.
29. El procedimiento de la reivindicación 25, en la que la secuencia terminadora 3' no traducida es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de glutelina de arroz.
30. El procedimiento de la reivindicación 25, en la que la secuencia terminadora 3' no traducida es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de lactato deshidrogenasa de arroz.
- 25 31. El procedimiento de la reivindicación 25, en la que la secuencia terminadora 3' no traducida es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de beta-tubulina de arroz.
32. El procedimiento de la reivindicación 25, en la que la secuencia terminadora 3' no traducida es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de proteína de choque térmico de trigo.
- 30 33. El procedimiento de la reivindicación 25, en la que la secuencia terminadora 3' no traducida es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de ubiquitina de trigo.
34. El procedimiento de la reivindicación 25, en la que la secuencia terminadora 3' no traducida es aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de fructosa 1,6-bisfosfatasa de trigo.
- 35 35. El procedimiento de la reivindicación 25, en la que la molécula de ADN recombinante comprende una primera secuencia intrónica aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de actina de arroz y una secuencia terminadora 3' no traducida aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de proteína de choque térmico de trigo.
- 40 36. El procedimiento de la reivindicación 25, en la que la molécula de ADN recombinante comprende una primera secuencia intrónica aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de actina de arroz y una secuencia terminadora 3' no traducida aislada a partir de una secuencia nucleotídica asociada a un gen de fructosa 1,6-bisfosfatasa de trigo.
37. El procedimiento de la reivindicación 35, en el que la molécula de ADN recombinante comprende una primera secuencia intrónica que comprende la SEQ ID NO:50 y una secuencia terminadora 3' no traducida que comprende la SEQ ID NO:58.
- 45 38. El procedimiento de la reivindicación 36, en el que la molécula de ADN recombinante comprende una primera secuencia intrónica que comprende la SEQ ID NO:50 y una secuencia terminadora 3' no traducida que comprende la SEQ ID NO:60.

39. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que la secuencia de codificación del ADN está en la orientación codificante.
40. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que la secuencia de codificación del ADN está en la orientación anticodificante.
- 5 41. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que el promotor es constitutivo, inducible, regulado por el desarrollo, regulado químicamente, potenciado por tejido o específico de tejido.

Figura 1

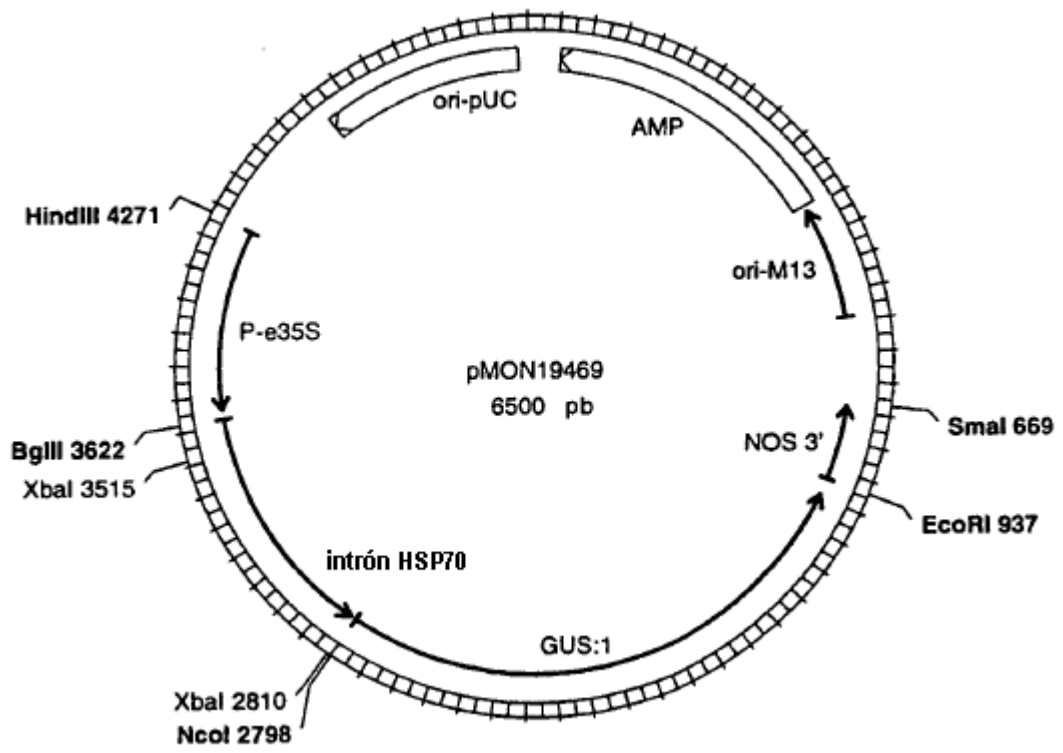


Figura 2

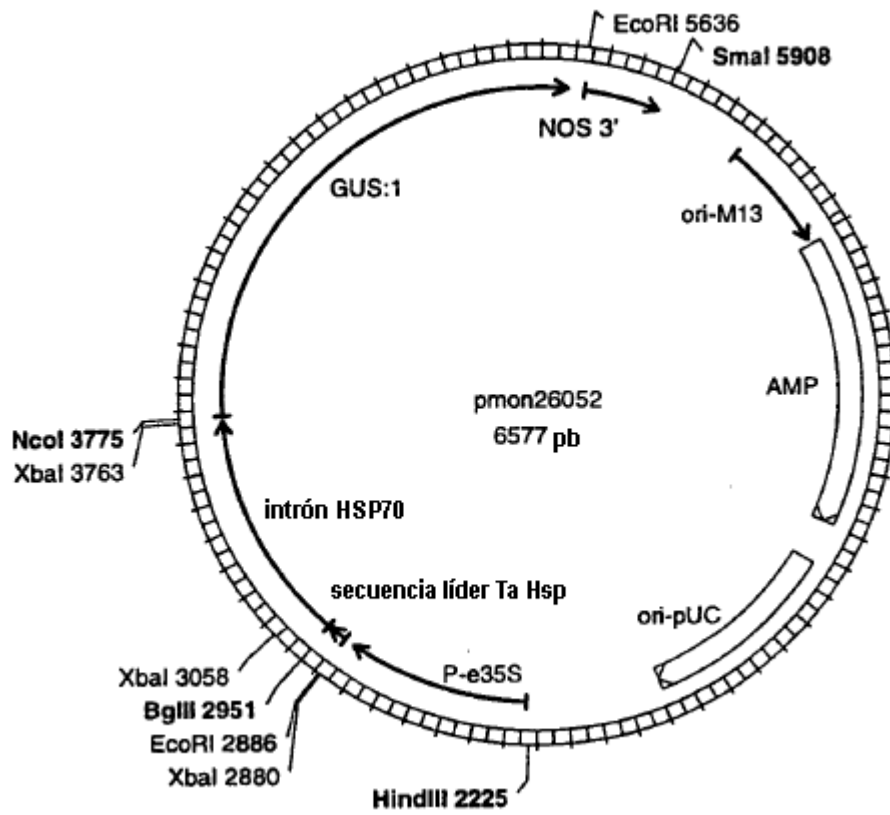


Figura 3

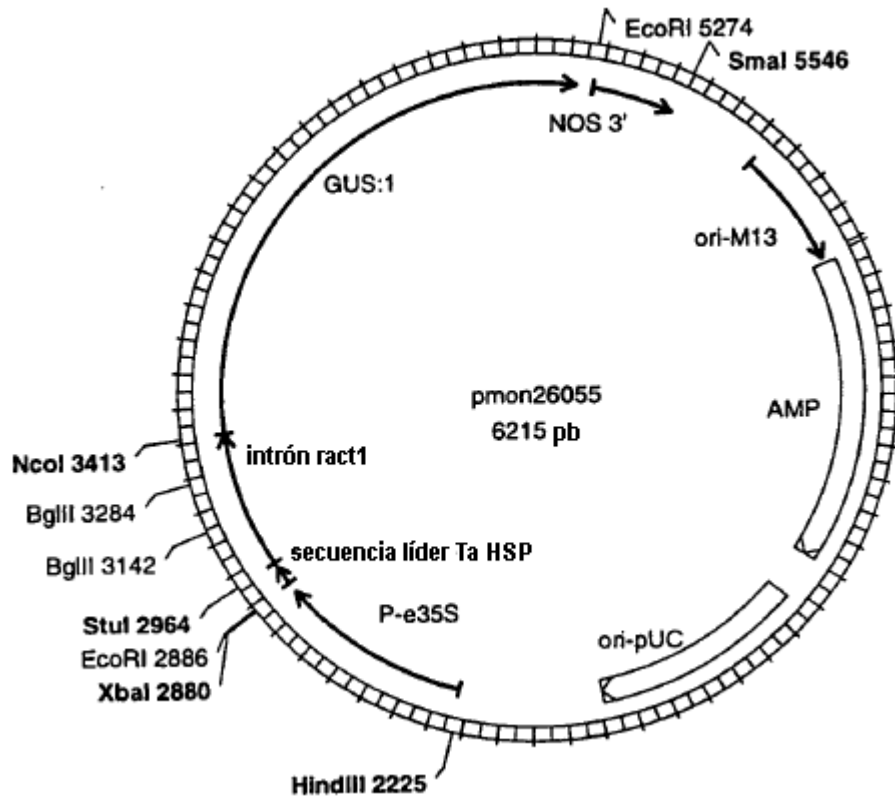


Figura 4

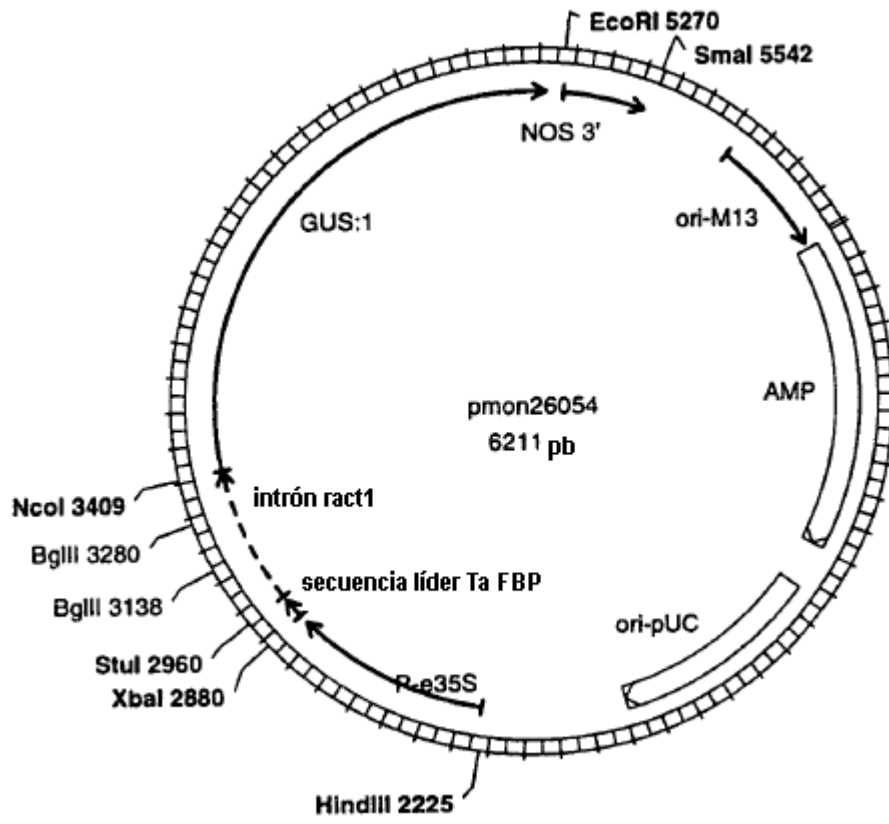


Figura 5

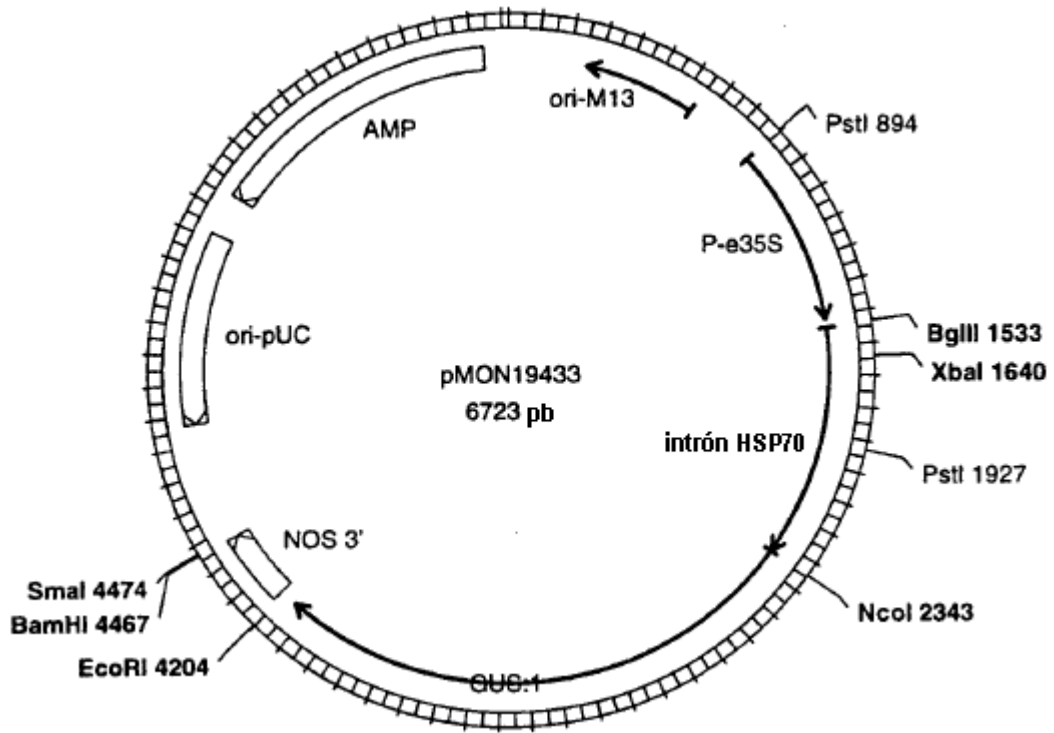


Figura 6

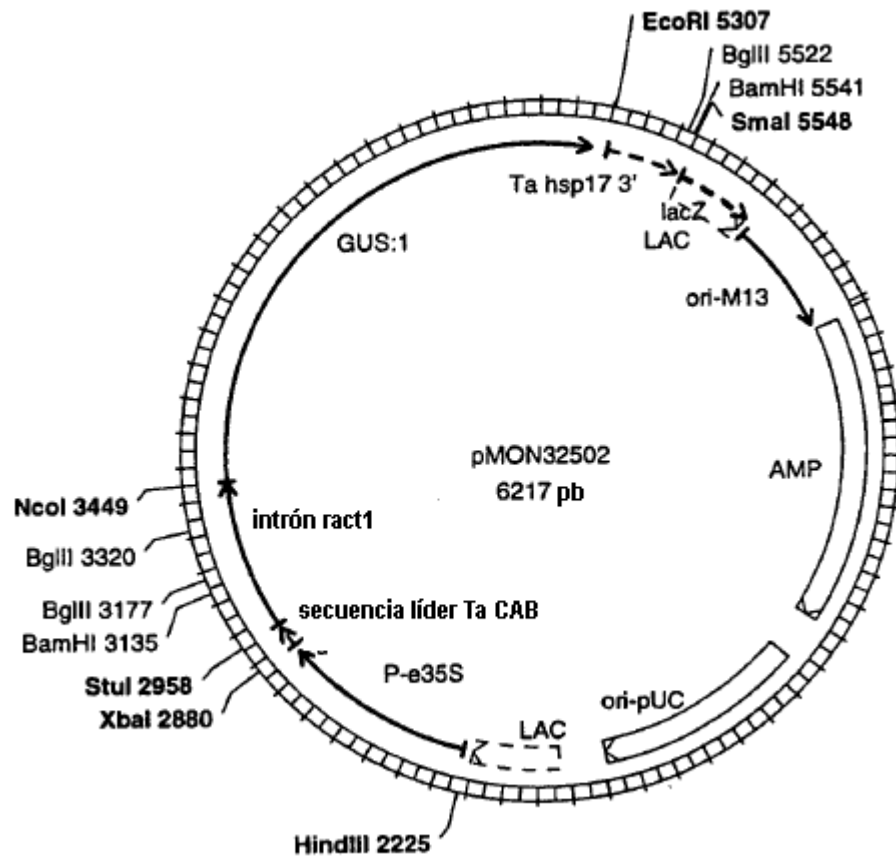


Figura 7

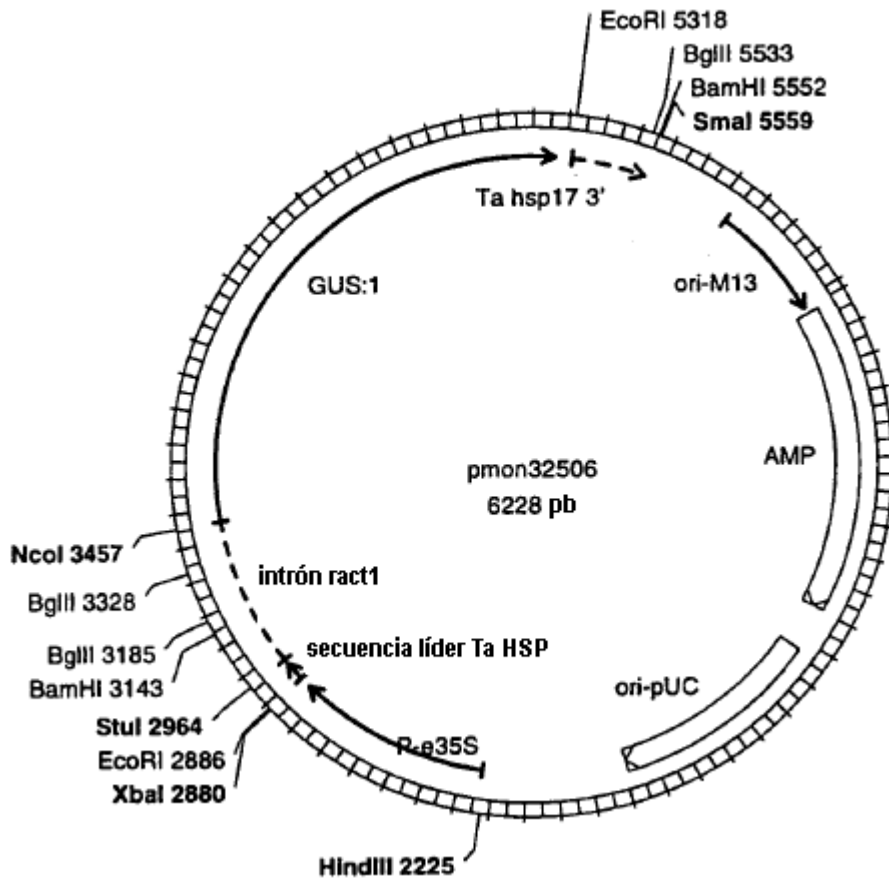


Figura 8

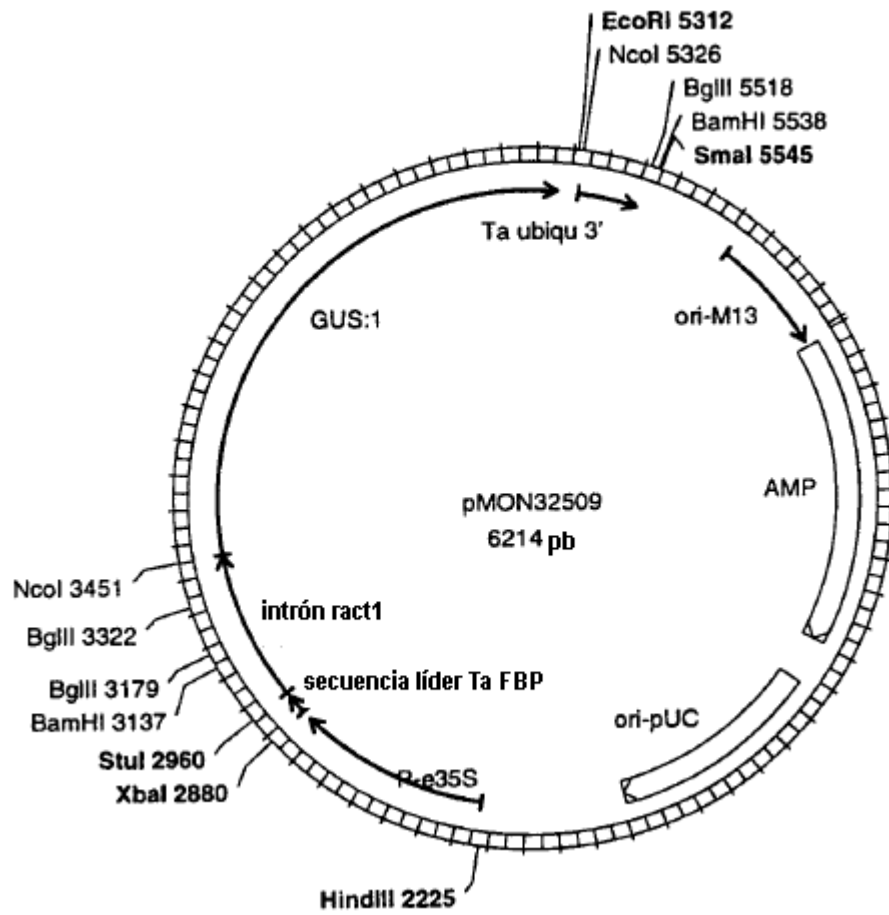


Figura 9

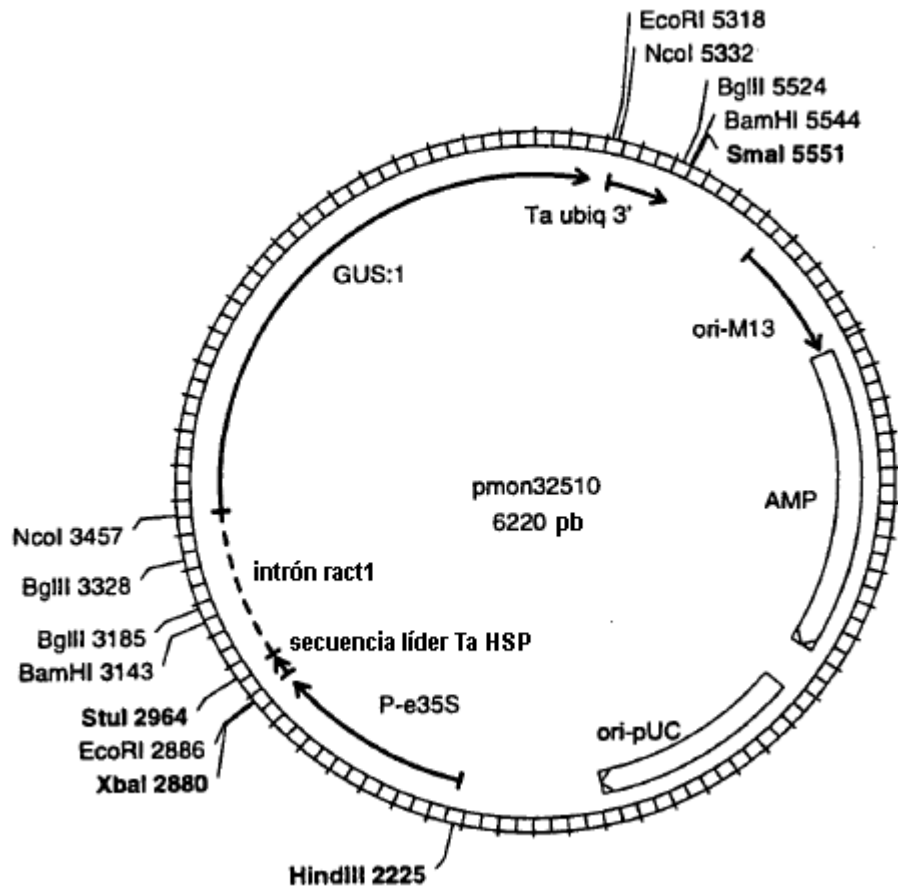


Figura 10

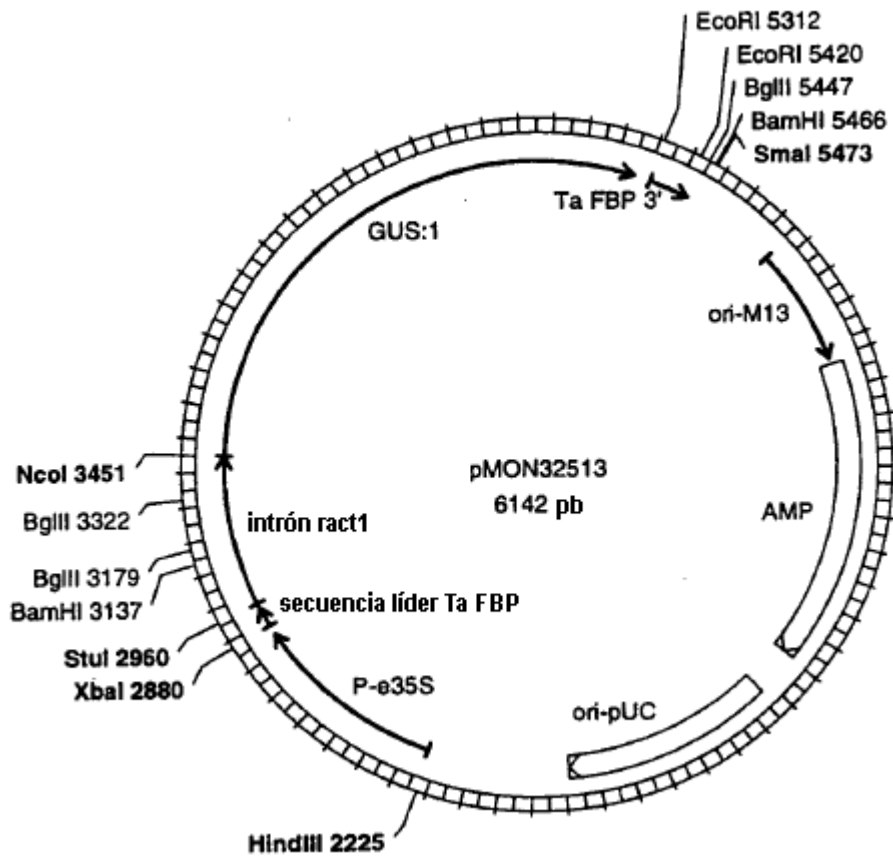


Figura 11

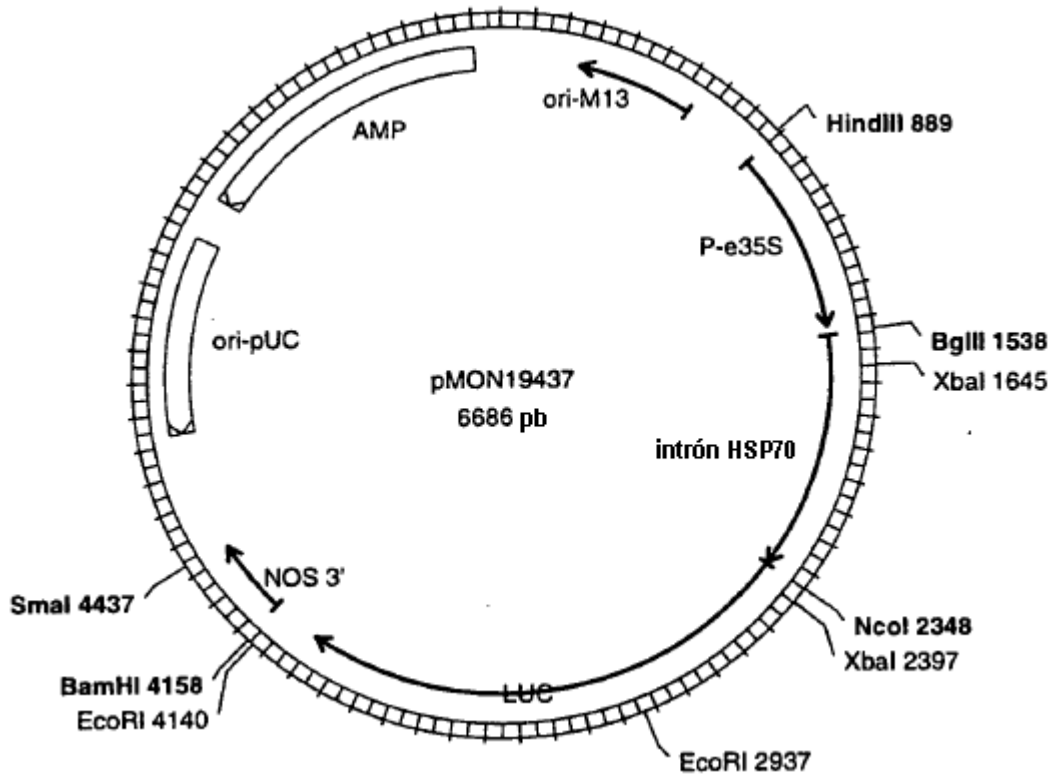


Figura 12

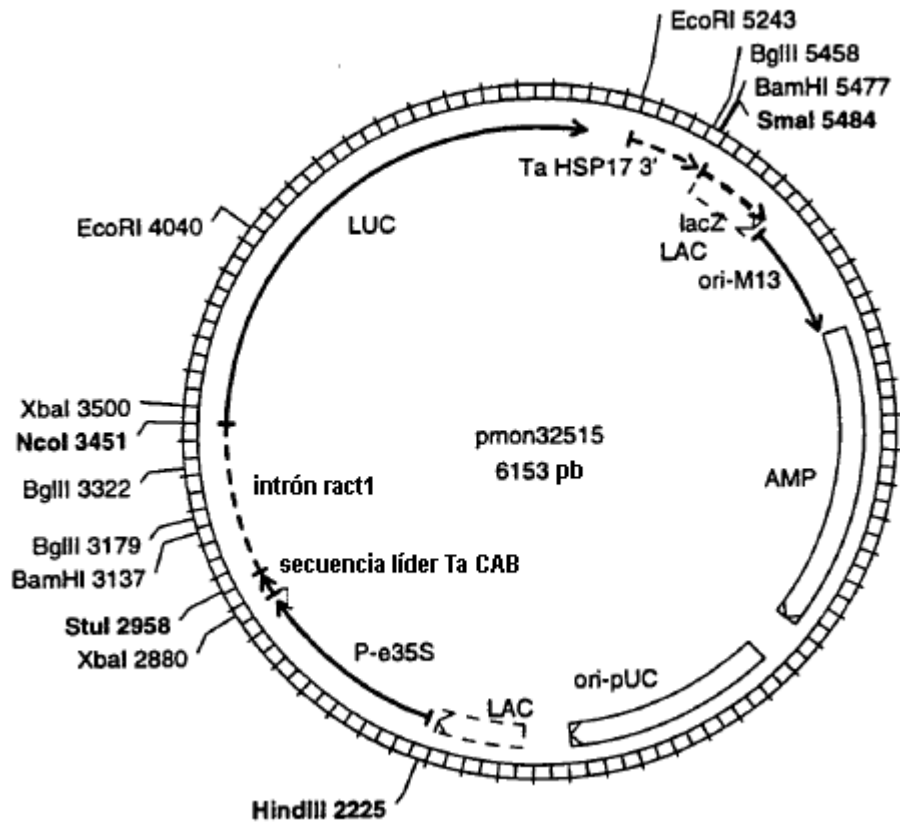


Figura 13

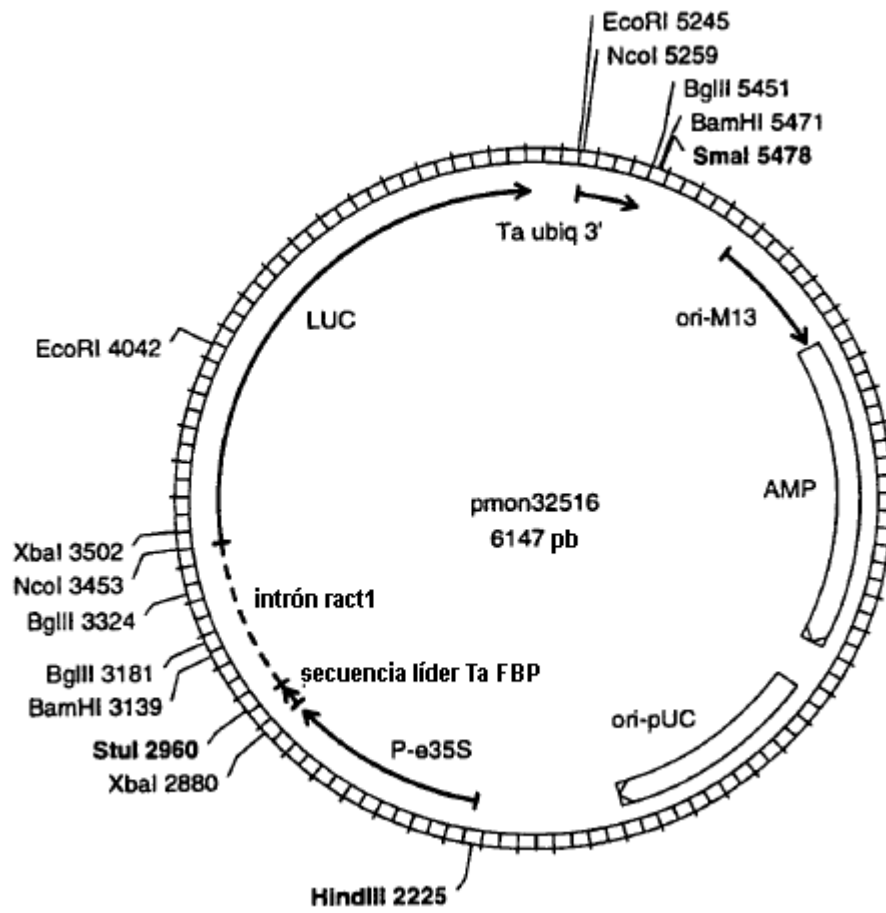


Figura 14

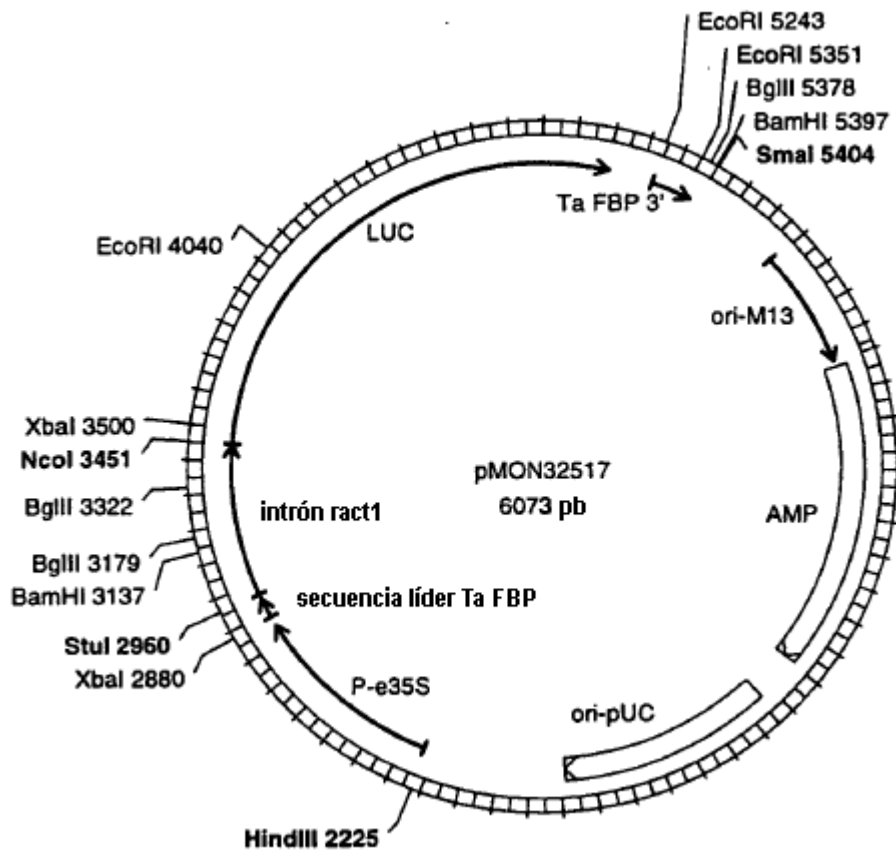


Figura 15

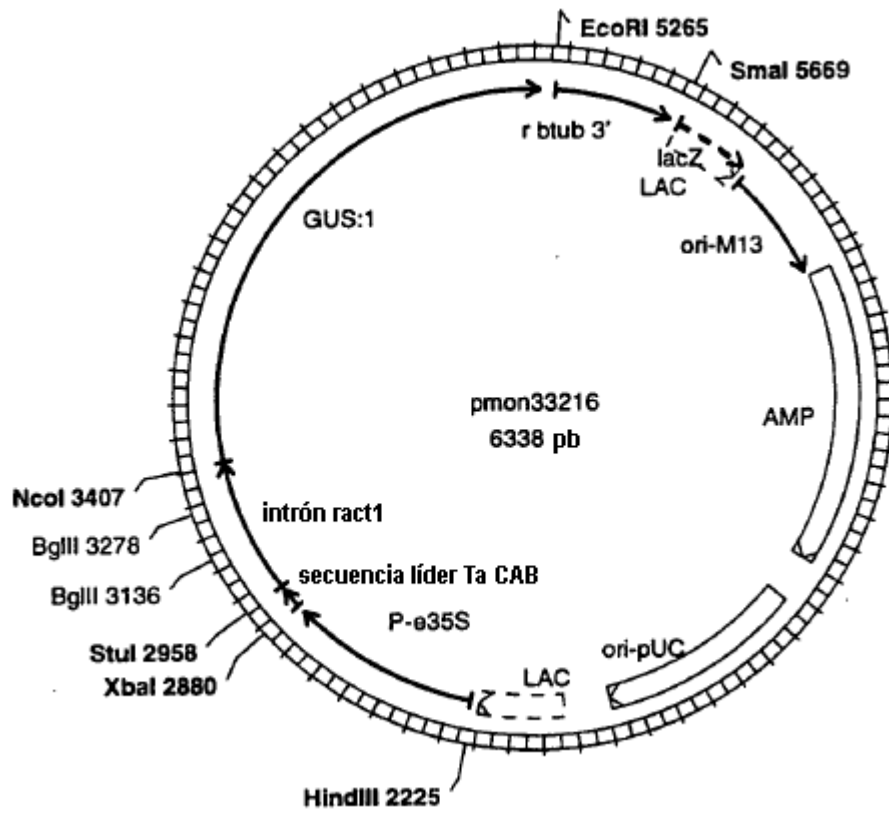


Figura 16

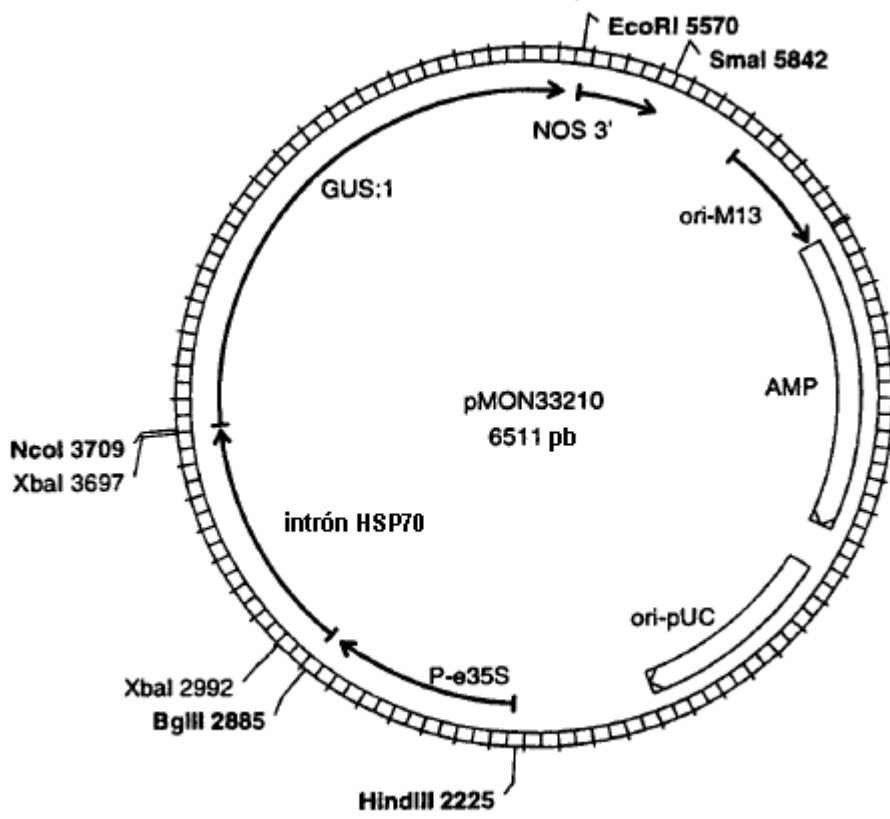


Figura 17

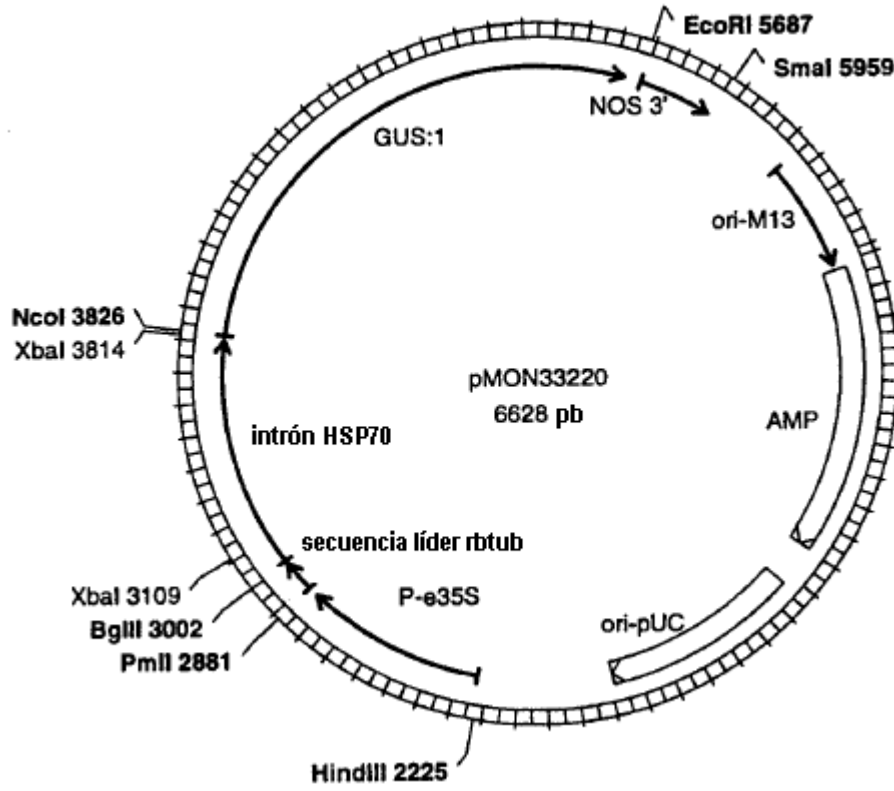


Figura 18

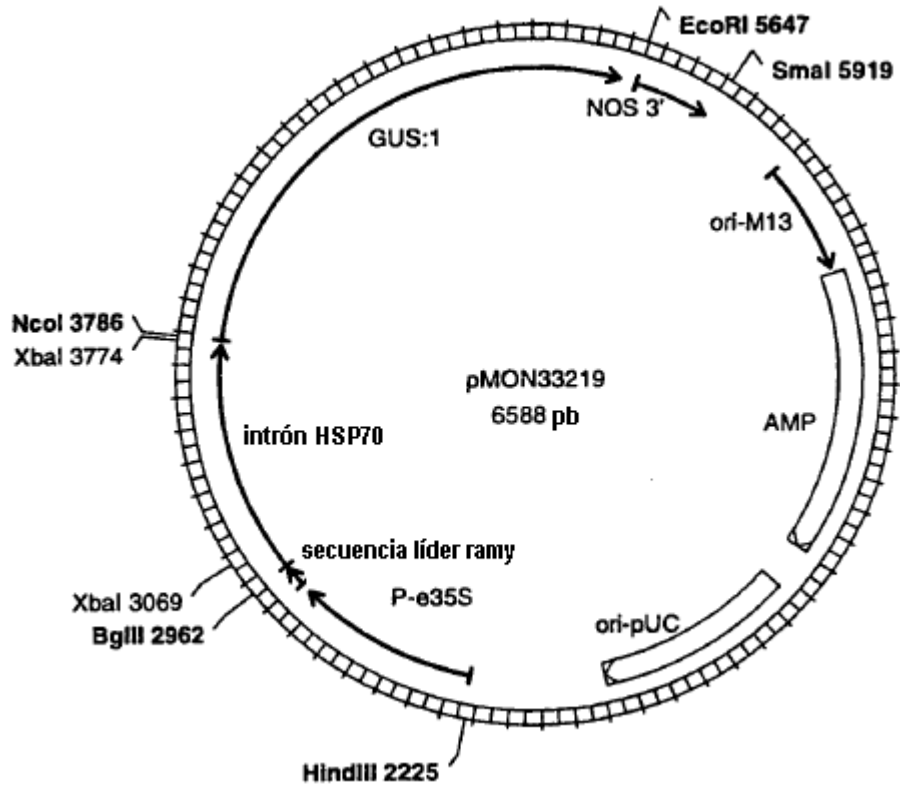


Figura 19

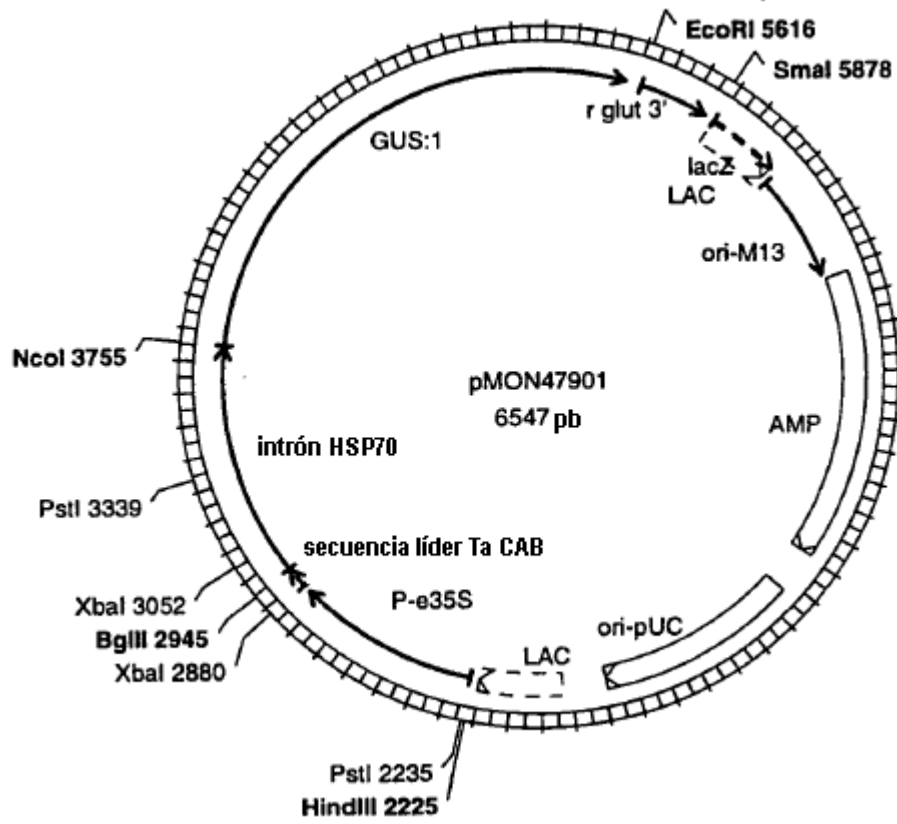


Figura 20

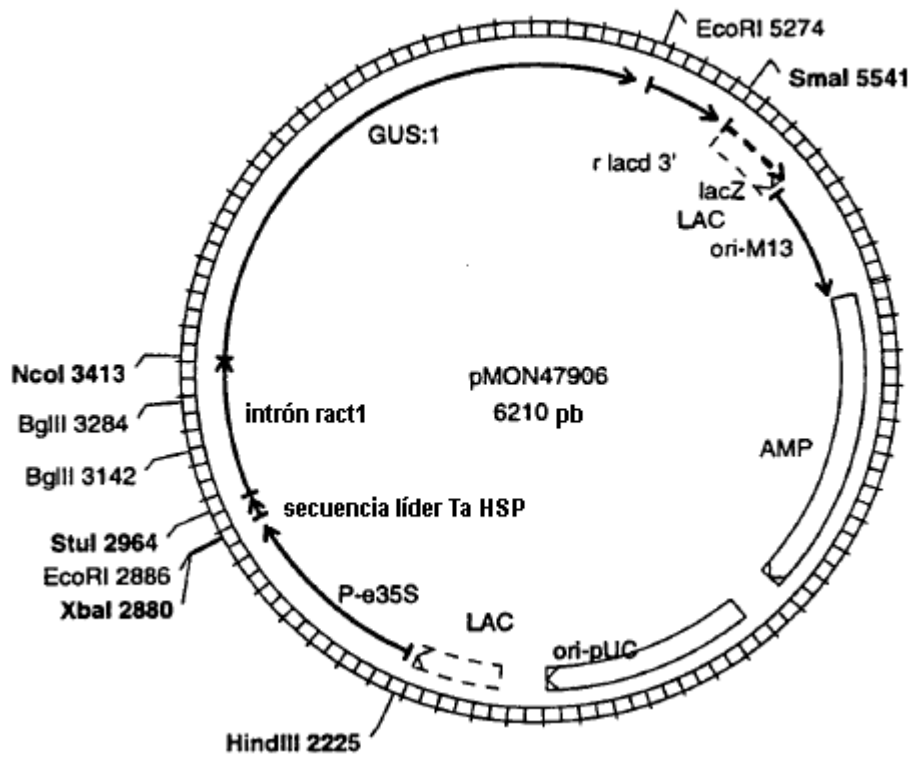


Figura 21

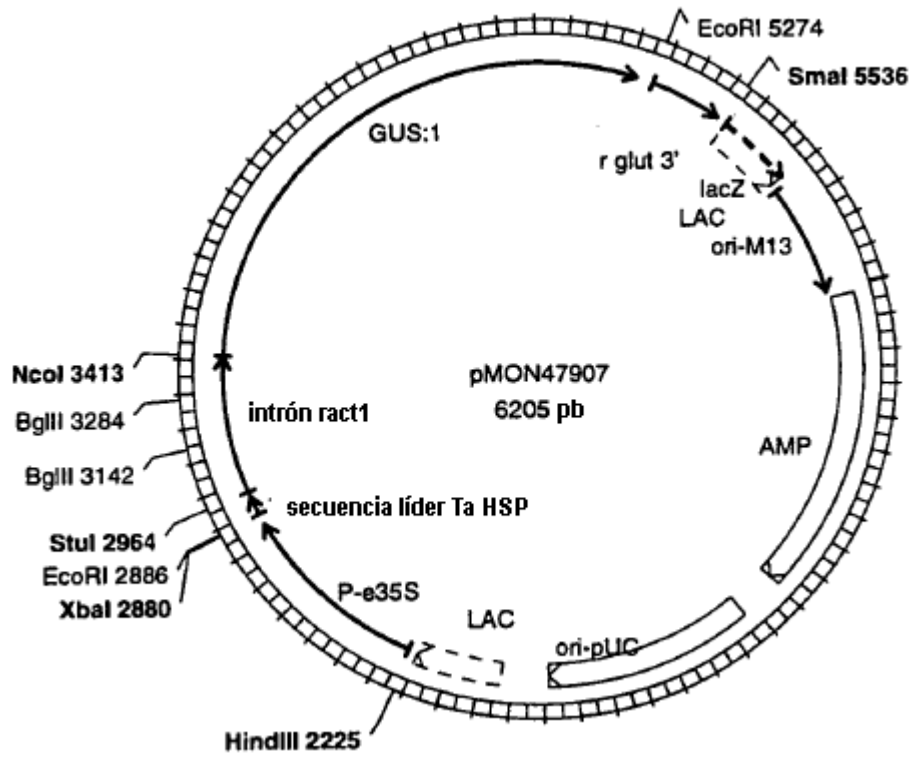


Figura 22

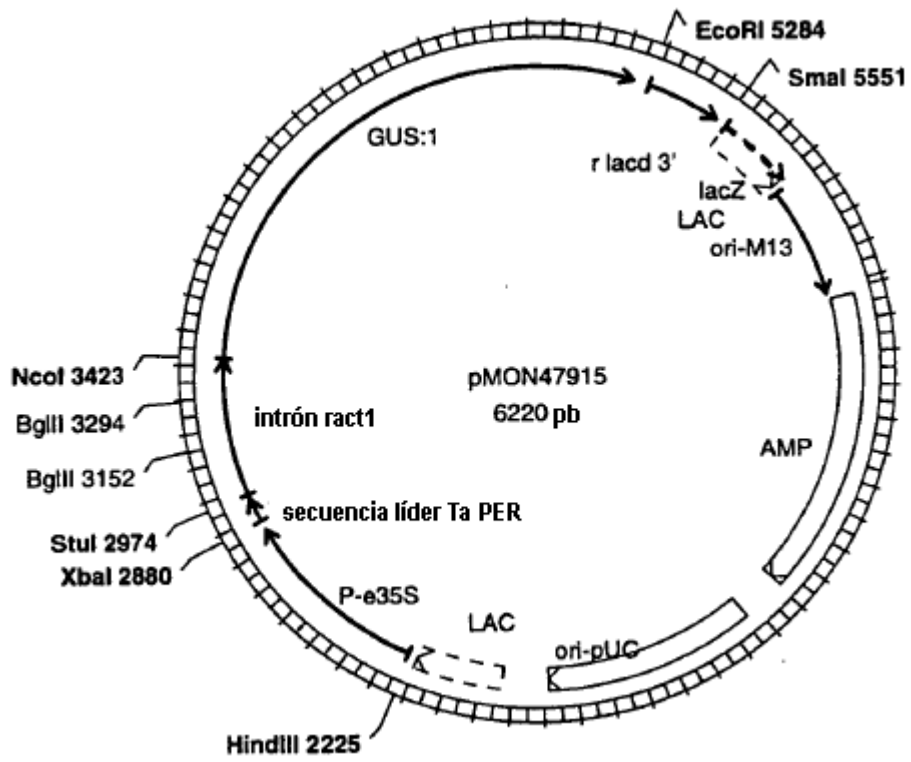


Figura 23

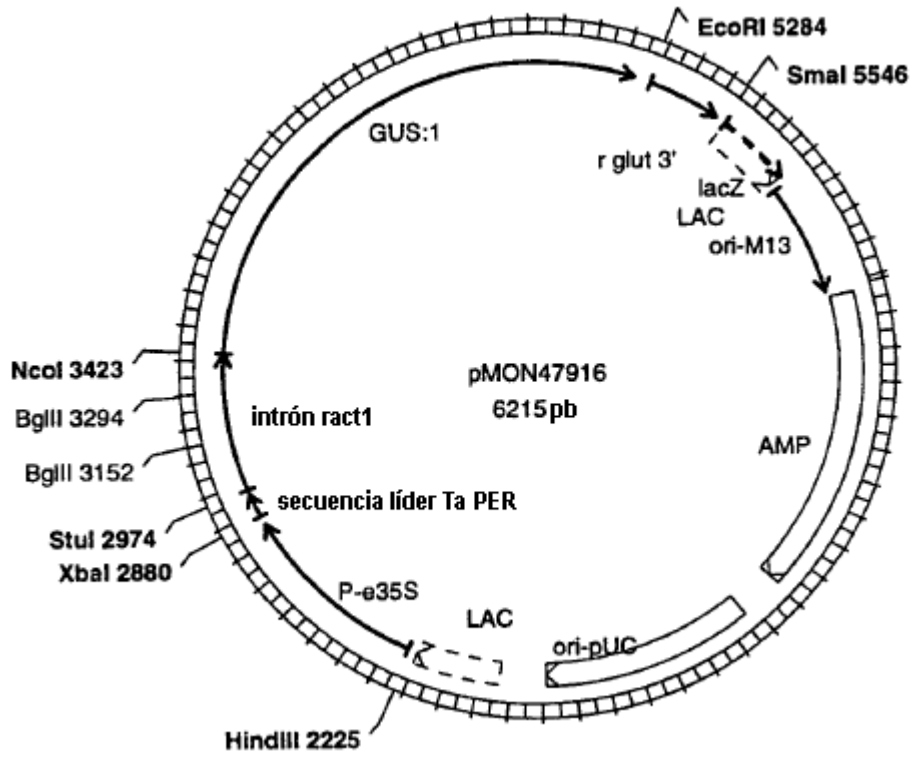


Figura 24

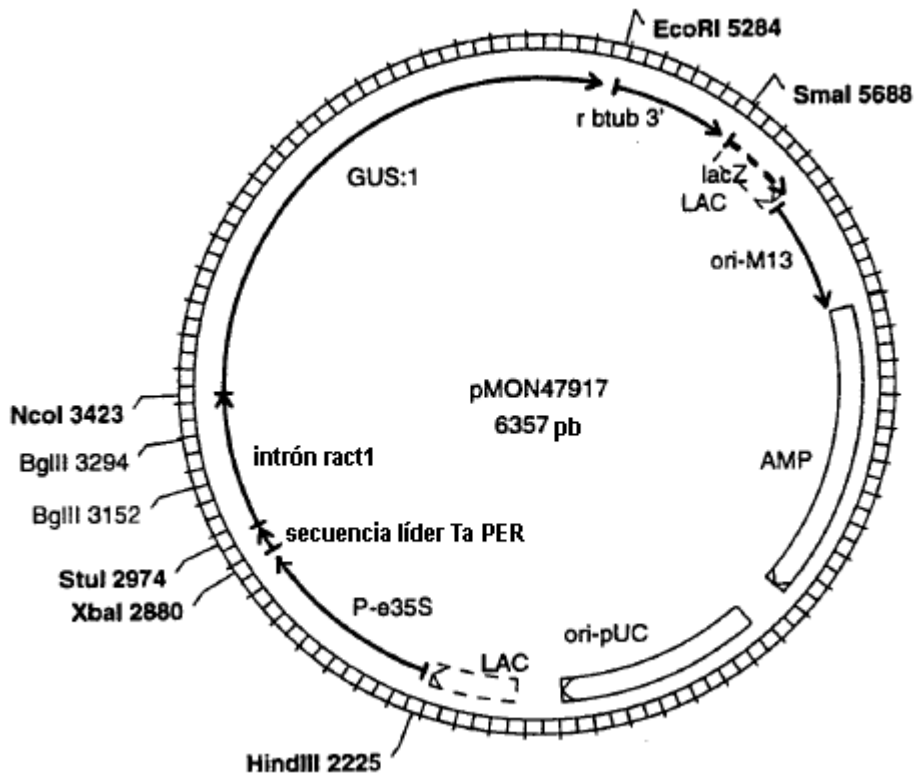


Figura 25

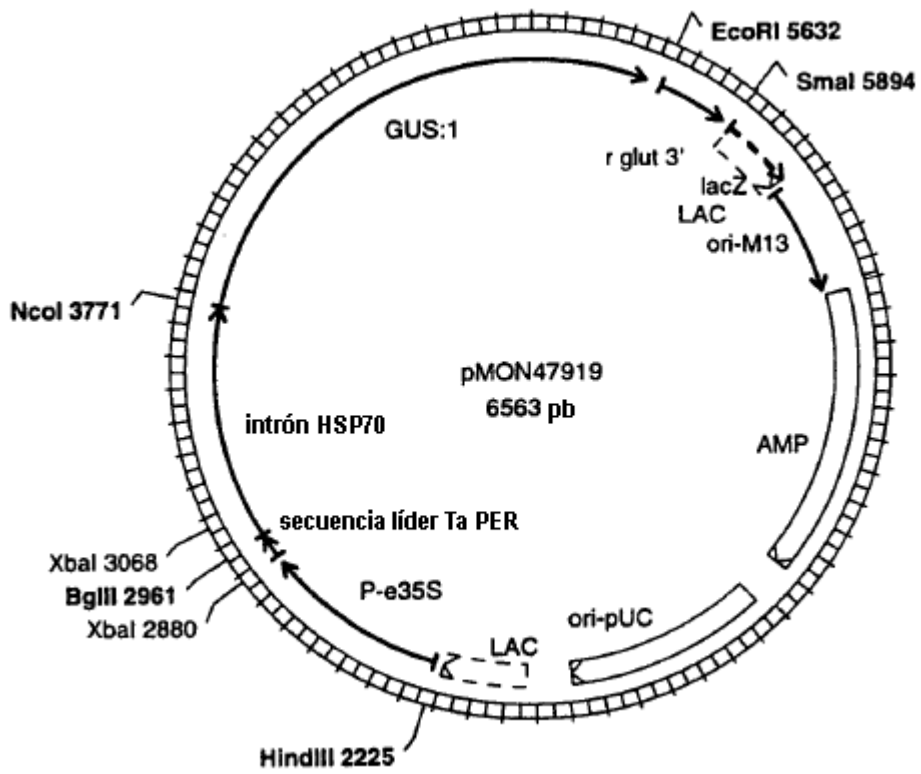


Figura 26

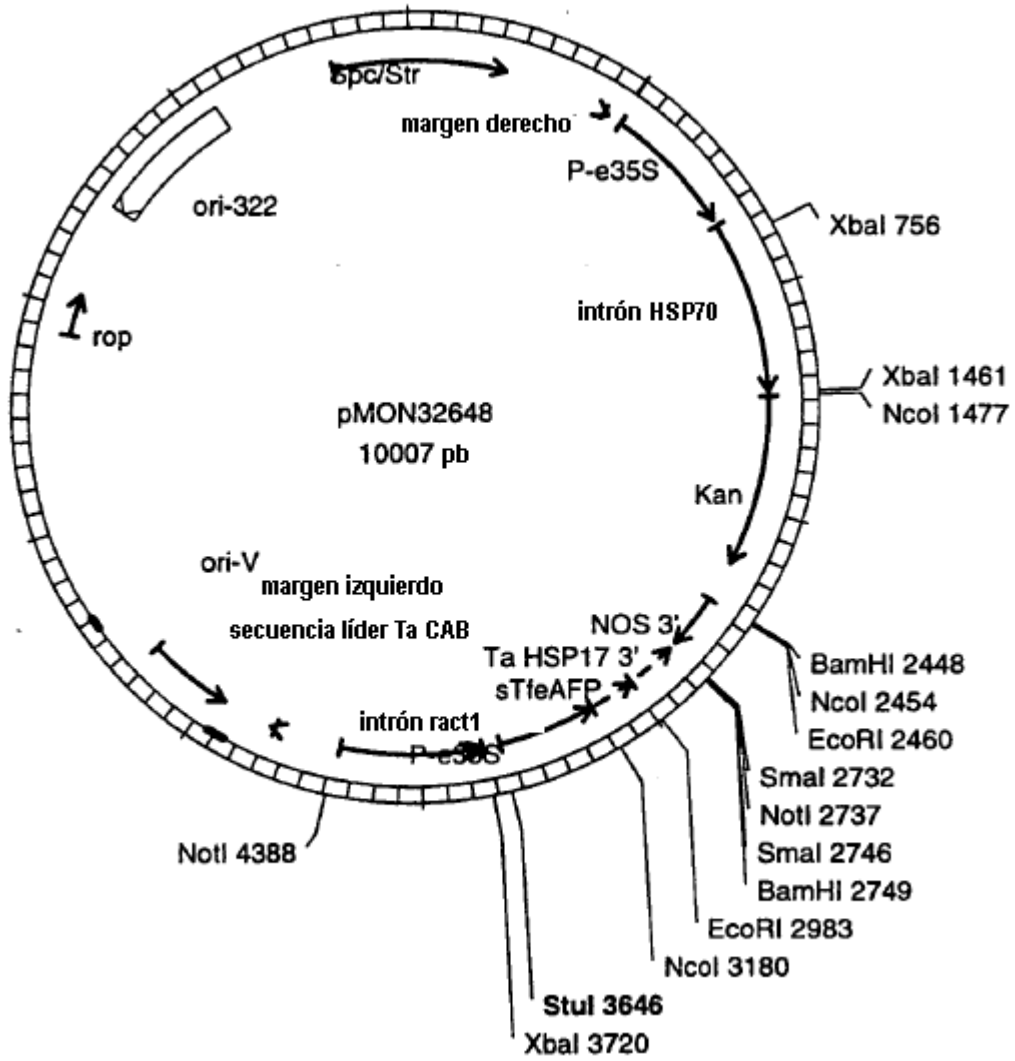


Figura 27

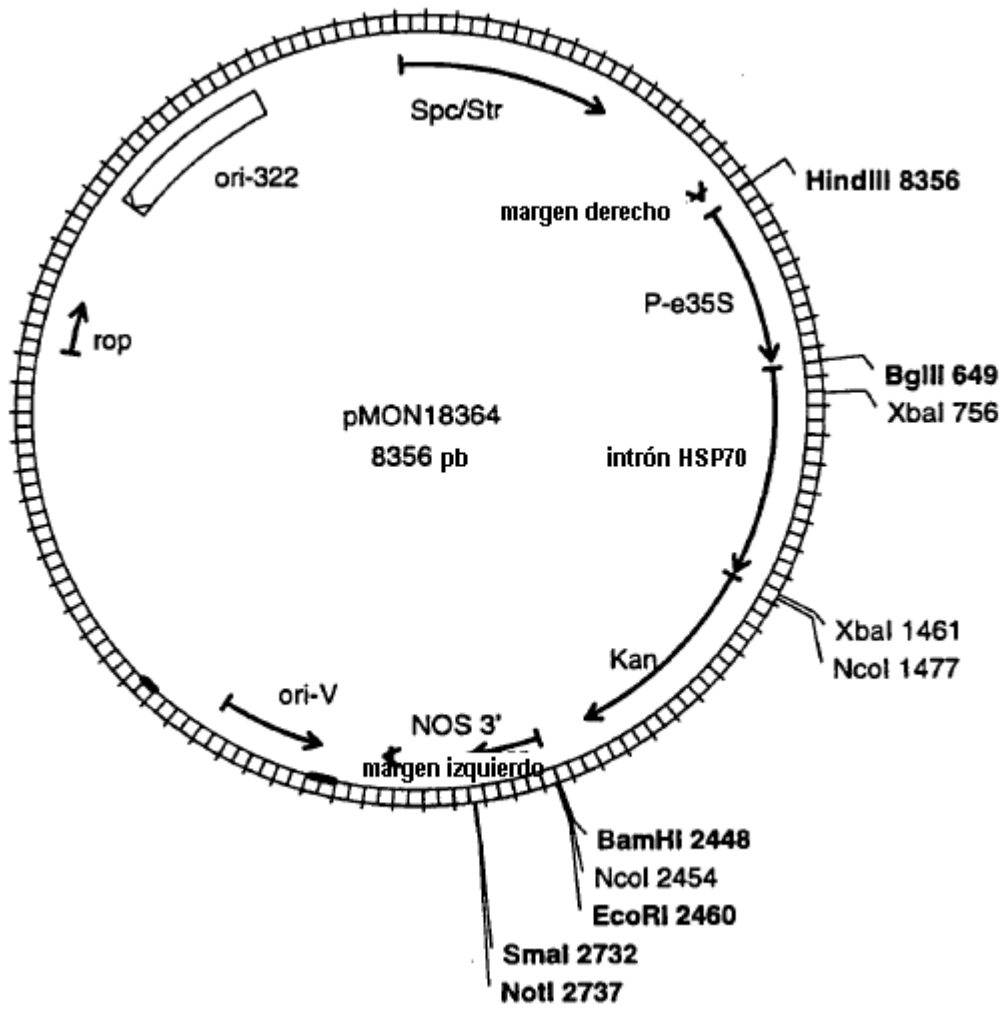


Figura 28

