

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 771**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **00984233 .7**  
96 Fecha de presentación: **12.12.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1240340**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.09.2002**

54 Título: **Construcciones de ADN para expresión de polipéptidos heterólogos en plantas**

30 Prioridad:  
**16.12.1999 US 171173 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.08.2012**

73 Titular/es:  
**MONSANTO TECHNOLOGY LLC  
800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD  
ST. LOUIS, MISSOURI 63167, US**

72 Inventor/es:  
**FINCHER, Karen, L.;  
FLASINSKI, Stanislaw y  
WILKINSON, Jack, Q.**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 386 771 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

Construcciones de ADN para expresión de polipéptidos heterólogos en plantas

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al aislamiento y uso de moléculas de ácido nucleico para control de expresión génica, específicamente nuevos promotores de plantas.

### Antecedentes de la invención

Uno de los objetivos de la ingeniería genética de plantas es producir plantas con características o rasgos agrónomicamente importantes. Recientes avances en la ingeniería genética han proporcionado las herramientas necesarias para producir plantas transgénicas que contengan y expresen genes ajenos (Kahl y col., World J. of Microbiol. Biotech. 11:449-460, 1995). Los rasgos o cualidades particularmente deseables de interés para ingeniería genética de plantas incluirían pero sin limitación resistencia a insectos, enfermedades fúngicas y otras plagas y agentes que provocan enfermedades, tolerancias a herbicidas, tiempo de conservación o estabilidad potenciados, rendimiento, tolerancias ambientales y potenciaciones nutricionales. Los avances tecnológicos en transformación y regeneración de plantas han permitido a los investigadores tomar ADN exógeno, tal como un gen o genes de una fuente heteróloga o nativa, e incorporar el ADN exógeno en el genoma de la planta. En un enfoque, la expresión de un nuevo gen que no se expresa normalmente en una planta partícula o tejido vegetal puede conferir un efecto fenotípico deseado. En otro enfoque, la transcripción de un gen o parte de un gen en una orientación antisentido puede producir un efecto deseable evitando o inhibiendo la expresión de un gen endógeno.

Para producir una planta transgénica, una construcción que incluye una secuencia de gen heterólogo que confiere un fenotipo deseado cuando se expresa en la planta se introduce en una célula vegetal. La construcción también incluye un promotor vegetal que se une operativamente a la secuencia del gen heterólogo, con frecuencia un promotor no asociado normalmente con el gen heterólogo. La construcción se introduce después en una célula vegetal para producir una célula vegetal transformada, y la célula vegetal transformada se regenera en una planta transgénica. El promotor controla la expresión de la secuencia de ADN introducida a la que se une operativamente el promotor y de este modo afecta a la característica deseada conferida por la secuencia de ADN.

Sería ventajoso tener varios promotores para adaptar la expresión génica de modo que se transcriba un gen o genes eficazmente en el momento correcto durante el crecimiento y desarrollo de la planta, en la localización óptima de la planta, y en la cantidad necesaria para producir el efecto deseado. Por ejemplo, la expresión constitutiva de un producto génico puede ser beneficiosa en una localización de la planta pero menos beneficiosa en otra planta de la planta. En otros casos, puede ser beneficioso tener un producto génico producido en un cierto estadio del desarrollo de la planta o en respuesta a ciertos estímulos ambientales o químicos. El desarrollo comercial de germoplasma mejorado genéticamente también ha avanzado al estadio de introducir múltiples rasgos en plantas de cultivo, con frecuencia denominado enfoque de apilamiento génico. En este enfoque, pueden introducirse múltiples genes que confieren diferentes características de interés a una planta. Es importante cuando se introducen múltiples genes en una planta que cada gen se module o controle para expresión óptima y que los elementos reguladores sean diversos para reducir el potencial de silenciamiento génico. A la luz de estas y otras consideraciones, resulta evidente que el control óptimo de la expresión génica y diversidad de elementos reguladores son importantes en la biotecnología de plantas.

### Sumario de la invención

40 La presente invención se refiere a un promotor híbrido que comprende las secuencias expuestas en SEC ID N°: 28. Dicho promotor híbrido es una secuencia promotora quimérica que comprende al menos un elemento potenciador *cis* de un promotor del Virus del Mosaico de la Escrofularia (FMV) unido operativamente con al menos un elemento *cis* de un promotor del factor de elongación de *Arabidopsis*  $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ), consistiendo este último esencialmente en una región reguladora 5' derivada de SEC ID N°: 12.

45 La invención se refiere además a una construcción de ADN que comprende: uno o más casetes de expresión que comprenden una secuencia de ADN promotora híbrida como se ha definido anteriormente y una secuencia de ADN estructural unida operativamente con el promotor híbrido.

El gen estructural puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos heteróloga en la que la expresión de la secuencia dé como resultado un rasgo o producto agrónomicamente útil en una planta de cultivo transgénica.

50 De acuerdo con otro aspecto de la invención hay una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN estructural unida operativamente con las secuencias promotoras de la presente invención que codifican una proteína empleada para conferir tolerancia a herbicidas a una planta de cultivo. Esta proteína de tolerancia a herbicidas incluye, pero sin limitación, genes de proteínas de tolerancia a glifosato tales como gen de EPSP sintasa resistente a glifosato solo, o en combinación con uno o más genes de proteína degradante de glifosato.

55 De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona una construcción de ADN tal como la descrita

anteriormente en la que la secuencia de ADN estructural es un gen de tolerancia a glifosato, de modo que cuando la construcción de ADN se introduce en una célula vegetal, confiere a la célula vegetal tolerancia a una formulación de glifosato acuosa que incluye al menos 50 gramos de equivalente ácido por litro (g a.e/l) de glifosato. En otras realizaciones relacionadas, la construcción de ADN confiere a la célula vegetal tolerancia a formulaciones de glifosato que tienen concentraciones de glifosato más altas (por ejemplo, al menos 300 gramos de equivalente ácido por litro de glifosato). De acuerdo con una realización, la construcción de ADN confiere a la célula vegetal tolerancia a al menos una aplicación de Roundup Ultra® a una tasa de 1,12 kg/hectárea (16 onzas (oz) por acre), por ejemplo, y en otras realizaciones, la tolerancia de glifosato se extiende a de una a dos o más aplicaciones de 1,12 kg/hectárea (16 onzas (oz) por acre), 2,24 kg/hectárea (32 onzas (oz) por acre) o 4,48 kg/hectárea (64 onzas (oz) por acre), por ejemplo.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporcionan plantas de cultivo transgénicas que se transforman con una construcción de ADN como se ha descrito anteriormente, incluyendo especies monocotiledóneas y especies dicotiledóneas. Los inventores han descubierto que los promotores de actina de *Arabidopsis* y EF1 $\alpha$  de *Arabidopsis* son suficientemente activos en otras especies vegetales de cultivo tales como algodón, tomate y girasol, por ejemplo, que cuando se usan para controlar la expresión de un gen de tolerancia a glifosato, tal como, aroA:CP4, las plantas toleran tasas de aplicación comerciales de glifosato, mostrando buena tolerancia vegetativa y bajo daño a tejidos reproductivos. Tales promotores también pueden usarse para expresar otros genes de interés en plantas, incluyendo, pero sin limitación, genes que confieren tolerancia a herbicidas, combate de insectos, resistencia a enfermedad, estabilidad o tiempo de conservación aumentados, mayor rendimiento, potenciación nutricional, expresión de un agente farmacéutico u otro producto polipeptídico deseado, o un cambio deseable en la fisiología o la morfología de la planta, y así sucesivamente.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporcionan plantas de cultivo transgénicas que se transforman con múltiples construcciones de ADN que comprenden los promotores de actina de *Arabidopsis* y EF1 $\alpha$  de *Arabidopsis* que son suficientemente activos en otras especies vegetales tales como algodón, tomate, girasol, por ejemplo, que cuando se usan para controlar la expresión de un gen de tolerancia a glifosato tal como aroA:CP4, las plantas toleraron las tasas de aplicación comerciales de glifosato, mostrando buena tolerancia vegetativa y bajo daño a tejidos reproductivos. Tales promotores pueden usarse también para expresar otros genes de interés en plantas, incluyendo, pero sin limitación, genes que confieren tolerancia a herbicidas, combate de insectos, resistencia a enfermedad, estabilidad o tiempo de conservación aumentados, mayor rendimiento, potenciación nutricional, expresión de un agente farmacéutico u otro producto polipeptídico deseado o un cambio deseable en la fisiología o morfología de la planta, y así sucesivamente.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporcionan plantas de cultivo transgénicas que se transforman con construcciones de ADN que comprenden los promotores de actina de *Arabidopsis* y EF1 $\alpha$  de *Arabidopsis* como moléculas de ADN quiméricas en fusión con moléculas de ADN de caulimovirus que tienen actividad promotora en plantas suficientemente activa en otras especies vegetales tales como algodón, tomate, colza, soja y girasol, por ejemplo, que cuando se usan para controlar la expresión de un gen de tolerancia a glifosato tal como aroA:CP4, las plantas toleran tasas de aplicación comerciales de glifosato, que muestran buena tolerancia vegetativa y bajo daño a tejidos reproductivos. Tales promotores también pueden usarse para expresar otros genes de interés en plantas, incluyendo, pero sin limitación, genes que confieren tolerancia a herbicidas, combate de insectos, resistencia a enfermedad, estabilidad o tiempo de conservación aumentados, mayor rendimiento, potenciación nutricional, expresión de un agente farmacéutico u otro producto polipeptídico deseado o un cambio deseado en la fisiología o morfología de la planta, y así sucesivamente.

De acuerdo con otra realización de la invención se proporcionan procedimientos para expresar una secuencia de ADN estructural en una planta. Tales procedimientos comprenden proporcionar una construcción de ADN como se ha descrito anteriormente, introducir la construcción de ADN en una célula vegetal y regenerar la célula vegetal para producir una planta de modo que el ADN estructural se pueda expresar en la planta. De acuerdo con una realización relacionada, se proporciona un procedimiento para combatir malas hierbas en el que la construcción de ADN comprende un gen de tolerancia a glifosato y se aplica a una planta de cultivo transformada con la construcción de ADN una cantidad de glifosato que es suficiente para combatir malas hierbas sin dañar significativamente a la planta de cultivo.

#### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un mapa plasmídico de pCGN8086  
 La Figura 2 es un mapa plasmídico de pMON45325  
 La Figura 3 es un mapa plasmídico de pMON45331  
 La Figura 4 es un mapa plasmídico de pMON45332  
 La Figura 5 es un mapa plasmídico de pCGN9190  
 La Figura 6 es un mapa plasmídico de pCGN9153  
 La Figura 7 es un mapa plasmídico de pCGN8099  
 La Figura 8 es un mapa plasmídico de pCGN8088  
 La Figura 9 es un mapa plasmídico de pCGN8068  
 La Figura 10 es un mapa plasmídico de pCGN8096

- 5 La Figura 11 es un mapa plasmídico de pCGN9151  
 La Figura 12 es un mapa plasmídico de pMON10156  
 La Figura 13 es un mapa plasmídico de pMON52059  
 La Figura 14 es un mapa plasmídico de pMON54952  
 La Figura 15 es un mapa plasmídico de pMON54953  
 La Figura 16 es un mapa plasmídico de pMON54954  
 La Figura 17 es un mapa plasmídico de pMON54955  
 La Figura 18 es un mapa plasmídico de pMON54956

**Breve descripción de la lista de secuencias**

- 10 SEC ID N°: 1 es el cebador de PCR directo usado para el aislamiento del promotor de Act2  
 SEC ID N°: 2 es el cebador de PCR inverso usado para el aislamiento del promotor de Act2  
 SEC ID N°: 3 es el cebador de PCR directo usado para el aislamiento del promotor de Act8  
 SEC ID N°: 4 es el cebador de PCR inverso usado para el aislamiento del promotor de Act8  
 15 SEC ID N°: 5 es el cebador de PCR directo usado para el aislamiento del promotor de Act11  
 SEC ID N°: 6 es el cebador de PCR inverso usado para el aislamiento del promotor de Act11  
 SEC ID N°: 7 es el cebador de PCR directo usado para el aislamiento del promotor de EF1  
 SEC ID N°: 8 es el cebador de PCR inverso usado para el aislamiento del promotor de EF1  
 SEC ID N°: 9 es la secuencia del promotor de Act2 que incluye la secuencia intrónica del gen Act2. Las posiciones  
 20 de bases 1 - 764 representan la secuencia promotora; las posiciones de base 765-1215 representan el intrón  
 seguido de 5 bases de región 5' no traducida (5' UTR) antes de la ATG; el sitio de inicio de la transcripción se  
 localiza en la posición de base 597.  
 SEC ID N°: 10 es la secuencia del promotor de Act8 que incluye el primer intrón del gen Act8. Las posiciones de  
 bases 1-797 representan la secuencia promotora; las posiciones de base 798-1259 representan el intrón seguido de  
 10 bases de 5' UTR antes de la ATG; el sitio de inicio de la transcripción se localiza en la posición de base 646.  
 25 SEC ID N°: 11 es la secuencia del promotor Act11 que incluye el primer intrón del gen Act11. Las posiciones de  
 bases 1-1218 representan la secuencia promotora; las posiciones de bases 1219-1381 representan el intrón seguido  
 de 10 bases de 5' UTR antes de la ATG; el sitio de inicio de la transcripción se localiza en la posición de base 1062.  
 SEC ID N°: 12 es la secuencia del promotor de EF1 que incluye el primer intrón del gen EF1. Las posiciones de  
 bases 1-536 representan la secuencia promotora; las posiciones de bases 537-1137 representan el intrón seguido  
 30 de 22 bases de 5' UTR antes de la ATG; el sitio de inicio de la transcripción se localiza en la posición de bases 481.  
 SEC ID N°: 13 es el cebador de PCR directo usado para el aislamiento del promotor de Act1a  
 SEC ID N°: 14 es el cebador de PCR directo usado para el aislamiento del promotor de Act1b  
 SEC ID N°: 15 es el cebador de PCR inverso usado para el aislamiento del promotor de Act1a y Act1b  
 SEC ID N°: 16 es el cebador de PCR directo usado para el aislamiento del promotor de Act3  
 35 SEC ID N°: 17 es el cebador de PCR inverso usado para el aislamiento del promotor de Act3  
 SEC ID N°: 18 es el cebador de PCR directo usado para el aislamiento del promotor de Act7  
 SEC ID N°: 19 es el cebador de PCR inverso usado para el aislamiento del promotor de Act7  
 SEC ID N°: 20 es el cebador de PCR directo usado para el aislamiento del promotor de Act12  
 SEC ID N°: 21 es el cebador de PCR inverso usado para el aislamiento del promotor de Act12  
 40 SEC ID N°: 22 es la secuencia del promotor de Act1a que incluye el primer intrón del gen Act1a. Las posiciones de  
 bases 1-1033 representan la secuencia promotora; las posiciones de bases 1034-1578 representan el intrón y 5'  
 UTR.  
 SEC ID N°: 23 es la secuencia del promotor de Act1b que incluye el primer intrón del gen Act1b. Las posiciones de  
 bases 1-914 representan la secuencia promotora; las posiciones de bases 915-1468 representan la secuencia de  
 45 intrón y 5' UTR.  
 SEC ID N°: 24 es la secuencia del promotor de Act3 que incluye el primer intrón del gen Act3. Las posiciones de  
 bases 1-1023 representan la secuencia promotora; las posiciones de bases 1024-1642 representan la secuencia de  
 intrón y 5' UTR.  
 SEC ID N°: 25 es la secuencia del promotor de Act7 que incluye el primer intrón del gen Act7. Las posiciones de  
 50 bases 1-600 representan la secuencia promotora; las posiciones de bases 601-1241 representan la secuencia de  
 intrón y 5' UTR.  
 SEC ID N°: 26 es la secuencia del promotor de Act12 que incluye el primer intrón del gen Act12. Las posiciones de  
 bases 1-1017 representan la secuencia promotora; las posiciones de bases 1018-1313 representan la secuencia de  
 intrón y 5' UTR.  
 55 SEC ID N°: 27 es la secuencia del promotor de FMV-Act11 químérico que incluye el primer intrón del gen Act11. Las  
 posiciones de bases 1-536 representan la secuencia promotora de FMV; las posiciones de bases 553-1946  
 representan el promotor de Actina 11 de *Arabidopsis*, secuencia de intrón y 5' UTR.  
 SEC ID N°: 28 es la secuencia del promotor de FMV-EF1 $\alpha$  químérico que incluye el primer intrón del gen EF1 $\alpha$ . Las  
 posiciones de bases 1-536 representan la secuencia promotora de FMV; las posiciones de bases 553-1695  
 60 representan el promotor de EF1 $\alpha$ , secuencia de intrón y 5' UTR.  
 SEC ID N°: 29 es la secuencia del promotor de CaMV-Act8 que incluye el primer intrón del gen Act8. Las posiciones  
 de bases 1-523 representan la secuencia promotora de CaMV; las posiciones de bases 534-1800 representan el  
 promotor de Act8, secuencia de intrón y 5' UTR.  
 SEC ID N°: 30 es la secuencia del promotor de CaMV-Act2 que incluye el primer intrón del gen Act2. Las posiciones

de bases 1-523 representan la secuencia promotora de CaMV; las posiciones de bases 534-1742 representan el promotor de Act2, secuencia de intrón y 5' UTR.

### **Descripción detallada de la invención**

5 Se proporcionan las siguientes definiciones y procedimientos para definir mejor y para guiar a los expertos habituales en la técnica en la práctica de la presente invención. A no ser que se indique de otro modo, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por los expertos habituales en la técnica relevante. Se usa la nomenclatura para bases de ADN como se expone en 37 CFR § 1.822. Se usa la nomenclatura de una y tres letras convencional para restos de aminoácidos.

10 “(Secuencia) de ácido nucleico” o “(secuencia) polinucleotídica” se refiere a ADN o ARN bicatenario o monocatenario de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas, respectivamente, leídas desde el extremo 5' (cadena arriba) al extremo 3' (cadena abajo). El ácido nucleico puede representar la hebra sentido o complementaria (antisentido).

15 “Nativo” se refiere a una secuencia de ácido nucleico de origen natural (“tipo silvestre”). Secuencia “heteróloga” se refiere a una secuencia que se origina de una fuente o especie ajena o, si es de la misma fuente, se modifica desde su forma original.

20 Una secuencia de ácido nucleico “aislada” está sustancialmente separada o purificada de otras secuencias de ácidos nucleicos con las que normalmente se asocia el ácido nucleico en la célula del organismo en la que aparece de forma natural el ácido nucleico, es decir, otro ADN cromosómico o extracromosómico. El término abarca ácidos nucleicos que se purifican de forma bioquímica de modo que se retienen sustancialmente los ácidos nucleicos contaminantes y otros componentes celulares. El término también abarca ácidos nucleicos recombinantes y ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

25 La expresión “sustancialmente purificada”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula separada de otras moléculas normalmente asociadas con ella en su estado nativo. Más preferentemente, una molécula sustancialmente purificada es la especie predominante presente en una preparación. Una molécula sustancialmente purificada puede ser más del 60 % sin, preferentemente 75 % sin, más preferentemente 90 % sin las otras moléculas (excluido el disolvente) presentes en la mezcla natural. La expresión “sustancialmente purificada” no pretende abarcar moléculas presentes en su estado nativo.

30 Una primera secuencia de ácido nucleico presenta “identidad sustancial” con una secuencia de ácido nucleico de referencia si, cuando se alinea de forma óptima (con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas que suman menos del 20 por ciento de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación) con el otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), hay al menos aproximadamente 75 % de identidad de secuencia de nucleótidos, preferentemente al menos aproximadamente 80 % de identidad, más preferentemente al menos 85 % de identidad, y más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de identidad sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótidos, preferentemente al menos 50 posiciones de nucleótidos, más preferentemente al menos 100 posiciones de nucleótidos, y más preferentemente sobre la longitud completa del primer ácido nucleico. Puede realizarse el alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981; por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970; por el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988; preferentemente por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA) en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics Versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI. El ácido nucleico de referencia puede ser una molécula de longitud completa o una parte de una molécula más larga. Como alternativa, los ácidos nucleicos tienen identidad sustancial si uno hibrida con el otro en condiciones rigurosas, como se define posteriormente.

45 Una primera secuencia de ácido nucleico está “unida operativamente” a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando las secuencias se disponen de tal modo que la primera secuencia de ácido nucleico afecte a la función de la segunda secuencia de ácido nucleico. Preferentemente, las dos secuencias son parte de una molécula de ácido nucleico contigua sencilla y más preferentemente están adyacentes. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a un gen si el promotor regula o media en la transcripción del gen en una célula.

50 Un ácido nucleico “recombinante” se prepara por una combinación artificial de dos segmentos separados de otro modo de secuencia, por ejemplo, por síntesis química o por la manipulación de segmentos aislados de ácidos nucleicos por técnicas de ingeniería genética. Se conocen bien técnicas para manipulación de ácidos nucleicos (véase por ejemplo Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1989; Mailga y col., Methods in Plant Molecular Biology, Cold Spring Harbor Press, 1995; Birren y col., Genome Analysis: volumen 1, Analyzing DNA, (1997), volumen 2, Detecting Genes, (1998), volumen 3, Cloning Systems, (1999) volumen 4, Mapping Genomes, (1999), Cold Spring Harbor, Nueva York).

55 Se analizan procedimientos para síntesis química de ácidos nucleicos, por ejemplo, en Beaucage y Carruthers, Tetra. Letts. 22: 1859-1862, 1981 y Matteucci y col., J. Am. Chem. Soc. 103: 3185, 1981. Puede realizarse síntesis

química de ácidos nucleicos, por ejemplo, en sintetizadores de oligonucleótidos automáticos comerciales.

Una "secuencia de ácido nucleico sintética" puede diseñarse y sintetizarse químicamente para expresión potenciada en células huésped particulares y para los fines de clonación en construcciones apropiadas. Las células huésped con frecuencia presentan un patrón preferido de uso codónico (Murray y col., 1989). Los ADN sintéticos diseñados para potenciar la expresión en un huésped particular deberían por lo tanto reflejar el patrón de uso codónico en la célula huésped. Están disponibles programas informáticos para estos fines incluyendo pero sin limitación los programas "BestFit" o "Gap" del Paquete de Software de Análisis de Secuencia, Genetics Computer Group, Inc., University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, WI 53711.

"Amplificación" de ácidos nucleicos o "reproducción de ácido nucleico" se refiere a la producción de copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico y se lleva a cabo usando tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se conoce en la técnica varios procedimientos de amplificación y se describe, entre otros, en las Patentes de Estados Unidos N°: 4.683.195 y 4.683.202 y en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis y col., Academic Press, San Diego, 1990. En PCR, un cebador se refiere a un oligonucleótido corto de secuencia definida que se hibrida con un molde de ADN para iniciar la reacción en cadena de la polimerasa.

"Transformado", "transfectado" o "transgénico" se refiere a una célula, tejido, órgano u organismo en el que se ha introducido un ácido nucleico ajeno, tal como una construcción recombinante. Preferentemente, el ácido nucleico introducido se integra en el ADN genómico de la célula, tejido, órgano u organismo receptor de modo que el ácido nucleico introducido se herede por la descendencia posterior. Una célula u organismo "transgénico" o "transformado" también incluye descendencia de la célula u organismo y descendencia producida a partir de un programa de reproducción que emplee una planta "transgénica" tal como un parental en un cruce y que muestre un fenotipo alterado resultante de la presencia de una construcción o construcción recombinante.

El término "gen" se refiere a ADN cromosómico, ADN plasmídico, ADNc, ADN sintético u otro ADN que codifica un péptido, polipéptido, proteína o molécula de ARN, y regiones que flanquean la secuencia codificante implicada en la regulación de la expresión. Algunos genes pueden transcribirse a ARNm y traducirse a polipéptidos (genes estructurales); otros genes pueden transcribirse a ARN (por ejemplo ARNr, ARNt); y otros tipos de genes actúan como reguladores de la expresión (genes reguladores).

"Expresión" de un gen se refiere a la transcripción de un gen para producir el ARNm correspondiente y traducción de este ARNm para producir el producto génico correspondiente, es decir, un péptido, polipéptido o proteína. La expresión génica se controla o modula por elementos reguladores que incluyen elementos reguladores 5' tales como promotores.

"Componente genético" se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico o elemento genético que también puede ser un componente o parte de una construcción de expresión. Los ejemplos de componentes genéticos incluyen, pero sin limitación regiones promotoras, líderes no traducidos 5', intrones, genes, regiones no traducidas 3' y otras secuencias reguladoras o secuencias que afectan a la transcripción o traducción de una o más secuencias de ácido nucleico.

Las expresiones "construcción de ADN recombinante", "construcción recombinante", "construcción de expresión" o "casete de expresión" se refieren a cualquier agente tal como un plásmido, cósmido, virus, BAC (cromosoma artificial de bacteria), secuencia de replicación autónoma, fago o secuencia de nucleótidos de ADN o ARN monocatenaria o bicatenaria lineal o circular, derivada de cualquier fuente, capaz de integración genómica o replicación autónoma, que comprende una molécula de ADN en la que se ha unido una o más secuencias de ADN de una manera funcionalmente operativa usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas.

"Complementario" se refiere a la asociación natural de secuencias de ácido nucleico por formación de pares de bases (pares A-G-T con la secuencia complementaria T-C-A). La complementariedad entre dos moléculas monocatenarias puede ser parcial, si solamente algunos de los pares de ácidos nucleicos son complementarios; o completa, si todos los pares de bases son complementarios. El grado de complementariedad afecta a la eficacia y fuerza de hibridación y reacciones de amplificación.

"Homología" se refiere al nivel de similitud entre secuencias de ácido nucleico o aminoácidos con respecto a porcentaje de nucleótidos o identidad posicional de aminoácidos, respectivamente, es decir, similitud o identidad de secuencia. La homología también se refiere al concepto de propiedades funcionales similares entre diferentes ácidos nucleicos o proteínas.

"Promotor" se refiere a una secuencia de ácido nucleico localizada cadena arriba o 5' de un codón de inicio de la traducción de una fase de abierta de lectura (o región codificante de proteínas) de un gen y que esté implicada en el reconocimiento y unión de ARN polimerasa II y otras proteínas (factores de transcripción que actúan en trans) para iniciar la transcripción. Un "promotor vegetal" es un promotor nativo o no nativo que es funcional en células vegetales. Los promotores constitutivos son funcionales en la mayoría o todos los tejidos de una planta durante el desarrollo de la planta. Se expresan promotores específicos de tejido, órgano o célula solamente o predominantemente en un tejido, órgano o tipo celular particular, respectivamente. En lugar de expresarse "específicamente" en un tejido, órgano o tipo celular dado, un promotor puede presentar expresión "potenciada", es

- decir, un nivel de expresión más alto en una parte (por ejemplo, tipo celular, tejido u órgano) de la planta en comparación con otras partes de la planta. Los promotores regulados temporalmente son funcionales solamente o predominantemente durante ciertos periodos del desarrollo de la planta o en ciertos momentos del día, como sucede con genes asociados con los ritmos circadianos, por ejemplo. Los promotores inducibles expresan selectivamente una secuencia de ADN unida operativamente en respuesta a la presencia de un estímulo endógeno o exógeno, por ejemplo por compuestos químicos (inductores químicos) o en respuesta a señales ambientales, hormonales, químicas y/o de desarrollo. Los promotores inducibles o regulados incluyen, por ejemplo, promotores regulados por luz, calor, estrés, inundación o sequía, fitohormonas, heridas o agentes químicos tales como etanol, jasmonato, ácido salicílico o protectores.
- Cualquier promotor vegetal puede usarse como una secuencia reguladora 5' para modular la expresión de un gen o genes particulares. Un promotor preferido sería un promotor de ARN polimerasa II vegetal. Los promotores de ARN polimerasa II vegetales, como los de otros eucariotas superiores, tienen estructuras complejas y están comprendidos por varios elementos diferentes. Un elemento tal es la caja TATA o caja Goldberg-Hogness, que se requiere para la expresión correcta de genes eucariotas *in vitro* e inicio de la transcripción *in vivo* preciso y eficaz. La caja TATA se sitúa normalmente a aproximadamente -25 a -35, es decir, a 25 a 35 pares de bases (pb) cadena arriba (5') del sitio de inicio de la transcripción, o sitio de recubrimiento, que se define como posición +1 (Breathnach y Chambon, Ann. Rev. Biochem. 50: 349-383, 1981; Messing y col., In: Genetic Engineering of Plants, Kosuge y col., eds., pp. 211-227, 1983). Otro elemento común, la caja CCAAT, se localiza entre -70 y -100 pb. En plantas, la caja CCAAT puede tener una secuencia consenso diferente que la secuencia funcionalmente análoga de promotores de mamíferos (el análogo vegetal se ha denominado la "caja AGGA" para diferenciarla de su homólogo animal; Messing y col., en: Genetic Engineering of Plants, Kosuge y col., eds., pp. 211-227, 1983). Además, prácticamente todos los promotores incluyen secuencias de activación cadena arriba adicionales o potenciadores (Benoist y Chambon, Nature 290: 304-310, 1981; Gruss y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 943-947, 1981 y Khoury y Gruss, Cell 27:313-314, 1983) que se extienden de aproximadamente -100 pb a -1000 pb o más cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción.
- Cuando se fusionan con secuencias de ADN heterólogas, tales promotores normalmente provocan que la secuencia fusionada se transcriba de una manera que es similar a la de la secuencia génica con la que normalmente se asocia el promotor. Pueden añadirse fragmentos promotores que incluyen secuencias reguladoras (por ejemplo, fusionadas con el extremo 5', o insertadas dentro, de un promotor activo que tiene sus propias secuencias reguladoras parciales o completas (Fluhr y col., Science 232: 1106-1112, 1986; Ellis y col., EMBO J. 6: 11-16, 1987; Strittmatter y Chua, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84: 8986-8990, 1987; Poulsen y Chua, Mol. Gen. Genet. 214: 16-23, 1988; Comai y col., Plant Mol. Biol. 15: 373-381, 1991). Como alternativa, pueden añadirse secuencias reguladoras heterólogas a la región cadena arriba 5' de un promotor inactivo truncado, por ejemplo, un promotor que incluye solamente la TATA central y, en ocasiones, los elementos CCAAT (Fluhr y col., Science 232: 1106-1112, 1986; Strittmatter y Chua, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84: 8986-8990, 1987; Aryan y col., Mol. Gen. Genet. 225: 65-71, 1991).
- Los promotores normalmente comprenden múltiples "elementos reguladores transcripcionales que actúan en *cis*" distintos, o simplemente "elementos en *cis*", cada uno de los cuales confiere un aspecto diferente del control global de la expresión génica (Strittmatter y Chua, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84: 8986-8990, 1987; Ellis y col., EMBO J. 6: 11-16, 1987; Benfey y col., EMBO J. 9: 1677-1684, 1990). Los "elementos en *cis*" se unen a factores proteicos que actúan en *trans* que regulan la transcripción. Algunos elementos en *cis* se unen a más de un factor, y los factores de transcripción que actúan en *trans* pueden interactuar con diferentes afinidades con más de un elemento en *cis* (Johnson y McKnight, Ann. Rev. Biochem. 58: 799-839, 1989). Se analizan factores de transcripción de plantas, elementos en *cis* correspondientes, y análisis de su interacción, por ejemplo, en: Martin, Curr. Opinions Biotech. 7: 130-138, 1996; Murai, en: Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology, Dashek, ed., CRC Press, 1997, pp. 397-422 y Methods in Plant Molecular Biology, Maliga y col., eds., Cold Spring Harbor Press, 1995, pp. 233-300. Las secuencias promotoras de la presente invención pueden contener "elementos en *cis*" que confieren o modulan la expresión génica.
- Los elementos en *cis* pueden identificarse por medio de varias técnicas, incluyendo análisis de delección, es decir, delecionar uno o más nucleótidos del extremo 5' o internos de un promotor; análisis de proteína de unión a ADN usando huella de Dnasa I, interferencia de metilación, ensayos de desplazamiento de movilidad en electroforesis, huella genómica *in vivo* por PCR mediada por ligación y otros ensayos convencionales; o por similitud de secuencia con motivos de elementos en *cis* conocidos por procedimientos de comparación de secuencia convencionales. La estructura fina de un elemento en *cis* puede estudiarse además por mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos del elemento o por otros procedimientos convencionales (véase por ejemplo, Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology, Dashek, ed., CRC Press, 1997, pp. 397-422 y Methods in Plant Molecular Biology, Maliga y col., eds., Cold Spring Harbor Press, 1995, pp. 233-300).
- Los elementos en *cis* pueden obtenerse por síntesis química o por clonación de promotores que incluyen tales elementos. Los elementos en *cis* también pueden sintetizarse con secuencias flanqueantes adicionales que contienen sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar manipulación posterior. En una realización, los promotores están comprendidos por múltiples "elementos en *cis*" distintos.
- El promotor híbrido de la invención comprende los "elementos en *cis*" de las secuencias de ácido nucleico de SEC ID N°: 12, que pueden identificarse usando programas informáticos que incluyen, pero sin limitación, MEME o

SIGNALSCAN que se diseñan específicamente para identificar elementos en *cis* o dominios o motivos dentro de las secuencias.

Los promotores vegetales también pueden incluir promotores producidos a través de la manipulación de promotores conocidos para producir promotores sintéticos, quiméricos o híbridos. Tales promotores también pueden combinar elementos en *cis* de uno o más promotores, por ejemplo, añadiendo una secuencia reguladora heteróloga a un promotor activo con sus propias secuencias reguladoras parciales o completas (Ellis y col., EMBO J. 6: 11-16, 1987; Strittmatter y Chua, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84: 8986-8990, 1987; Poulsen y Chua, Mol. Gen. Genet. 214: 16-23, 1988; Comai y col., Plant. Mol. Biol. 15: 373-381, 1991). También se han desarrollado promotores quiméricos añadiendo una secuencia reguladora heteróloga a la región cadena arriba 5' de un promotor inactivo truncado, es decir un promotor que incluye solamente la TATA central y, opcionalmente, los elementos CCAAT (Fluhr y col., Science 232: 1146-1112, 1986; Strittmatter y Chua, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84: 8986-8990, 1987; Aryan y col., Mol. Gen. Genet. 225: 65-71, 1991).

Los promotores quiméricos o híbridos de acuerdo con la presente invención pueden incluir al menos un elemento en *cis* conocido tal como elementos que se regulan por numerosos factores ambientales tales como luz, calor o estrés; elementos que se regulan o inducen por patógenos o agentes químicos y similares. Tales elementos pueden regular de forma positiva o negativa la expresión génica, dependiendo de las condiciones. Los ejemplos de elementos en *cis* incluyen, pero sin limitación, elementos sensibles a oxígeno (Cowen y col., J. Biol. Chem. 268(36): 26904, 1993), elementos reguladores de la luz (véase, por ejemplo Bruce y Quail, Plant Cell 2: 1081, 1990 y Bruce y col., EMBO J. 10: 3015, 1991), un elemento en *cis* sensible a tratamiento con metil jasmonato (Beaudoin y Rothstein, Plant Mol. Biol. 33: 835, 1997), elementos sensibles a ácido salicílico (Strange y col., Plant J. 11: 1315, 1997), elementos de respuesta a choque térmico (Pelham y col., Trends Genet. 1: 31, 1985), elementos sensibles a heridas y estrés abiótico (Loace y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 9230, 1992; Mhiri y col., Plant Mol. Biol. 33: 257, 1997), elementos sensibles al frío (Baker y col., Plant Mol. Biol. 24: 701, 1994; Jiang y col., Plant Mol. Biol. 30: 679, 1996; Nordin y col., Plant Mol. Biol. 21: 641, 1993; Zhou y col., J. Biol. Chem. 267: 23515, 1992), y elementos sensibles a sequía (Yamaguchi y col., Plant Cell 6: 251-264, 1994; Wang y col., Plant Mol. Biol. 28: 605, 1995; Bray E. A. Trends in Plant Science 2: 48, 1997).

Los promotores híbridos pueden diseñarse o modificarse por ingeniería genética mediante varios procedimientos. Muchos promotores contienen secuencias cadena arriba que activan, potencian o definen la fuerza y/o especificidad del promotor (Atchison, Ann. Rev. Cell Biol. 4: 127, 1988). Los genes de ADN T, por ejemplo que contienen cajas "TATA" que definen el sitio de inicio de la transcripción y otros elementos cadena arriba localizados cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción, modulan los niveles de transcripción (Gelvin, en: Transgenic Plants (Kung, S.-D. y Us, R., eds, San Diego: Academic Press, pp.49-87, 1988). Otro promotor quimérico combinó un trímero del activador de octopina sintasa (ocs) con el activador de manopina sintasa (mas) más promotor y se ha indicado un aumento de la expresión de un gen indicador (Min Ni y col., The Plant Journal 7: 661, 1995). Las secuencias reguladoras cadena arriba de la presente invención pueden usarse para la construcción de tales promotores quiméricos o híbridos. Los procedimientos para construcción de promotores variantes de la presente invención incluyen pero sin limitación combinar elementos de control de diferentes promotores o duplicar partes o regiones de un promotor (véase por ejemplo Patente de Estados Unidos 5.110.732 y Patente de Estados Unidos 5.097.025). Los expertos en la materia están familiarizados con las condiciones específicas y procedimientos para la construcción, manipulación y aislamiento de macromoléculas (por ejemplo, moléculas de ADN, plásmidos, etc.), generación de organismos recombinantes y la exploración y aislamiento de genes (véase por ejemplo Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1989; Mailga y col., Methods in Plant Molecular Biology, Cold Spring Harbor Press, 1995; Birren y col., Genome Analysis: volumen 1, Analyzing DNA, (1997), volumen 2, Detecting Genes, (1998), volumen 3, Cloning Systems, (1999) volumen 4, Mapping Genomes, (1999), Cold Spring Harbor, Nueva York).

El diseño, la construcción y el uso de promotores quiméricos o híbridos que comprenden el elemento en *cis* de SEC ID N°: 12, para modular o regular la expresión de secuencias de ácido nucleico unidas operativamente, también están abarcados por la presente invención.

La secuencia promotora de SEC ID N°: 28 es capaz de transcribir secuencias de ADN unidas operativamente en múltiples tejidos y por lo tanto puede regular selectivamente la expresión de genes en múltiples tejidos.

Para varios rasgos agrícolas, la transcripción de un gen o genes de interés es deseable en múltiples tejidos para conferir la característica o características deseadas. La disponibilidad de promotores adecuados que regulen la transcripción de genes unidos operativamente en tejidos diana seleccionados de interés es deseable, puesto que puede no ser deseable expresar un gen en cada tejido, sino solamente en ciertos tejidos. Por ejemplo, si se desea expresar selectivamente un gen diana para expresión de gen para tolerancia a herbicidas, se puede desear expresión del gen de tolerancia a herbicidas en tejidos vegetativos y reproductores. Las secuencias promotoras de la presente invención son útiles para regular la expresión génica en múltiples tejidos incluyendo, pero sin limitación, tejidos del meristema de crecimiento rápido, tejidos reproductivos masculinos (androceo) tales como polen, anteras y filamentos, y tejidos reproductivos femeninos (gineceo) tales como el estigma, estilo y ovarios, hojas, sépalos y pétalos. Los promotores de la presente invención tienen por lo tanto utilidad para expresión de genes de tolerancia a herbicida, por ejemplo, cuando se desea tolerancia en múltiples tejidos y estadios del desarrollo vegetal. Las

secuencias promotoras de la presente invención tienen utilidad para regular la transcripción de cualquier gen diana incluyendo pero sin limitación genes para control de la fertilidad, rendimiento, tolerancia a insectos, tolerancia fúngica, tolerancia a herbicidas o cualquier rasgo deseable de interés. Los genes particularmente preferidos incluyen genes de tolerancia a herbicidas o genes de tolerancia a insectos.

5 En una realización, los promotores de la presente invención tienen particular utilidad para regular la expresión de un gen de tolerancia a herbicidas cuando se desee expresión de un gen en múltiples tejidos. Por ejemplo, el gen de tolerancia a herbicidas puede conferir tolerancia al herbicida glifosato. Los ejemplos de genes de tolerancia a glifosato adecuados incluyen, pero sin limitación genes de EPSP sintasa resistente a glifosato o productos génicos que degradan glifosato tales como una glifosato oxidorreductasa y fosfonato N-acetil transferasa. Es importante  
10 tener una amplia diversidad de elecciones de elementos reguladores 5' para cualquier estrategia de biotecnología vegetal para tener elementos reguladores adecuados que sean más eficaces para el perfil de expresión deseado.

En otra realización, los promotores de la presente invención tienen utilidad para determinar la función génica. La función de muchos genes es desconocida y los promotores de la presente invención pueden usarse como elementos genéticos en una construcción para permitir una evaluación fenotípica de uno o más genes expresados en una orientación sentido o antisentido. Los promotores de la presente invención pueden ser componentes en una  
15 construcción de expresión en plantas desarrollada para un ensayo de alto rendimiento en el que se deseen altos niveles de expresión génica en tejidos constitutivos y reproductores.

Cualquier planta puede seleccionarse con respecto a la identificación de genes y secuencias reguladoras. Ejemplos de dianas vegetales adecuadas para el aislamiento de genes y secuencias reguladoras incluirían pero sin limitación  
20 alfalfa, manzana, albaricoque, *Arabidopsis*, alcachofa, rúcula, espárrago, aguacate, banana, cebada, judías, remolacha, mora, arándano, brócoli, coles de Bruselas, col, colza, cantalupo, zanahoria, mandioca, ricino, coliflor, apio, cereza, achicoria, cilantro, cítricos, clementinas, trébol, coco, café, maíz, algodón, arándano agrio, pepino, abeto de Douglas, berenjena, endivia, escarola, eucalipto, hinojo, higo, ajo, cucurbitáceas, uva, pomelo, melón verde, jícama, kiwi, lechuga, puerro, limón, lima, pino taeda, lino, mango, melón, champiñón, nectarina, nuez, avena,  
25 palma aceitera, colza, oca, oliva, cebolla, naranja, una planta ornamental, palma, papaya, perejil, chirivía, guisante, melocotón, cacahuete, pera, pimiento, caqui, pino, piña, plátano, ciruela, granada, álamo, patata, calabaza gigante, membrillo, pino insigne, achicoria roja, rábano, colza, frambuesa, arroz, centeno, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, calabaza, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, boniato, liquidámbar, tangerina, té, tabaco, tomate, triticale, césped, nabo, vid, sandía, trigo, ñames y calabacín. Son plantas particularmente preferidas para la  
30 identificación de secuencias reguladoras *Arabidopsis*, maíz, trigo, soja y algodón.

Las secuencias promotoras de la presente invención se aislaron de ADN vegetal de *Arabidopsis thaliana*. En una realización preferida, una construcción incluye las secuencias promotoras de la presente invención unidas operativamente con una secuencia transcribible junto con secuencias terminadoras y reguladoras adecuadas. Una construcción tal puede transformarse en una planta diana adecuada de interés. Cualquier planta puede usarse como  
35 un huésped adecuado para construcciones de ácido nucleico que comprenden las secuencias promotoras de la presente invención. Los ejemplos de plantas diana adecuadas de interés incluirían, pero sin limitación, alfalfa, brócoli, col, colza, coliflor, maíz, algodón, arándano agrio, pepino, lechuga, guisante, álamo, pino, patata, cebolla, arroz, frambuesa, soja, caña de azúcar, remolacha azucarera, girasol, tomate y trigo.

#### Procedimientos de Aislamiento y Modificación de Promotores

40 Puede usarse cualquier variedad de procedimientos para aislar fragmentos de las secuencias promotoras desveladas en el presente documento. Puede usarse un enfoque basado en PCR para amplificar regiones flanqueantes de una biblioteca genómica de una planta usando información de secuencia disponible públicamente. Se conocen varios procedimientos por los expertos en la materia para amplificar secuencias de ADN desconocidas adyacentes a una región central de secuencia conocida. Los procedimientos incluyen pero sin limitación PCR  
45 inversa (PCRi), PCR vectorette, PCR en forma de Y y enfoques de *walking* de genoma. Para la presente invención las moléculas de ácido nucleico se aislaron de *Arabidopsis* diseñando cebadores de PCR basados en información de secuencia disponible.

También pueden obtenerse fragmentos de ácido nucleico por otras técnicas tales como sintetizando directamente el fragmento por medios químicos, como se practica habitualmente usando un sintetizador de oligonucleótidos  
50 automático. También pueden obtenerse fragmentos por la aplicación de tecnología de reproducción de ácido nucleico, tal como la tecnología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) por técnicas de ADN recombinante generalmente conocidas por los expertos en la materia de biología molecular. Con respecto a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo por PCR) usando un par de cebadores de amplificación particular, las "condiciones de PCR rigurosas" se refieren a condiciones que permiten que el par de cebadores hibriden  
55 solamente con la secuencia de ácido nucleico diana con la que se uniría un cebador que tenga la secuencia de tipo silvestre correspondiente (o su complemento) y preferentemente para producir un producto de amplificación único.

Los expertos en la materia conocen procedimientos para preparación de ADN genómico de plantas. En un enfoque, pueden prepararse bibliotecas de ADN genómico de una especie seleccionada por digestión parcial con una enzima de restricción y seleccionando por tamaño los fragmentos de ADN dentro de un intervalo de tamaños particular. El

ADN genómico puede clonarse en una construcción adecuada que incluye pero sin limitación un bacteriófago, y prepararse usando una construcción adecuada tal como un bacteriófago usando un kit de clonación adecuado de cualquier variedad de distribuidores (véase por ejemplo Stratagene, La Jolla CA o Gibco BRL, Gaithersburg, MD).

5 Además de su uso en la modulación de la expresión génica, las secuencias promotoras de la presente invención también tienen utilidad como sondas o cebadores en experimentos de hibridación de ácido nucleico. Las sondas y los cebadores de ácido nucleico de la presente invención pueden hibridar en condiciones rigurosas con una secuencia de ADN diana. La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se define como condiciones en las que una sonda o cebador hibrida específicamente con una secuencia o secuencias diana y no con secuencias no diana, como se puede determinar de forma empírica. La expresión "condiciones rigurosas" se define funcionalmente con respecto a la hibridación de una sonda de un ácido nucleico un ácido nucleico diana (es decir, con una secuencia de ácido nucleico particular de interés) mediante el procedimiento de hibridación específico (véase por ejemplo Sambrook y col., 1989, en 9.52-9.55, Sambrook y col., 1989 en 9.47-9.52, 9.56-9.58; Kanehisa, Nucl. Acids Res. 12:203-213, 1984; y Wetmur y Davidson, J. Mol. Biol. 31:349-370, 1968). Las condiciones de rigurosidad apropiada que promueven la hibridación de ADN son, por ejemplo, cloruro sódico 6,0 x/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado de SSC 2,0 x a 50 °C, se conocen por los expertos en la materia o pueden encontrarse en manuales de laboratorio que incluyen pero sin limitación, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado puede seleccionarse de una baja rigurosidad de aproximadamente SSC 2,0 x a 50 °C hasta una alta rigurosidad de aproximadamente SSC 0,2 x a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente a 22 °C, a condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variarse, o la temperatura o la concentración salina pueden mantenerse constantes mientras que la otra variable se cambia. Por ejemplo, la hibridación usando sondas de ADN o ARN o cebadores puede realizarse a 65 °C en SSC 6x, SDS 0,5 %, Denhardt 5x, ADN no específico 100 µg/ml (por ejemplo, ADN de esperma de salmón sonicado) con lavado a SSC 0,5x, SDS 0,5 % a 65 °C, para alta rigurosidad.

Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si muestran complementariedad completa. Como se usa en el presente documento, se dice que las moléculas muestran "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario de un nucleótido de la otra. Se dice que dos moléculas son mínimamente complementarias si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan hibridadas entre sí en al menos condiciones de "baja rigurosidad" convencionales. De forma similar, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridar entre sí con suficiente estabilidad para permitir que se mantengan hibridadas entre sí en condiciones de "alta rigurosidad" convencionales. Se contempla que pueden usarse condiciones de hibridación de rigurosidad más baja tales como temperaturas de lavado y/o hibridación más bajas para identificar secuencias relacionadas que tengan un grado más bajo de similitud de secuencia si se conserva especificidad de unión de la sonda o cebador con secuencia o secuencias diana. En consecuencia, las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden usarse por su capacidad para formar selectivamente moléculas de doble cadena con tramos complementarios de fragmentos de ADN. Se conoce bien por los expertos en la materia la detección de segmentos de ADN mediante hibridación, y por lo tanto, dependiendo de la aplicación prevista, se deseará emplear diversas condiciones de hibridación para conseguir diversos grados de selectividad de sonda hacia secuencia diana y el procedimiento de elección dependerá de los resultados deseados. Se describen condiciones de rigurosidad convencionales en Sambrook, y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, y por Haymes y col., Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC, 1985.

45 La secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 12, o un fragmento, región, elemento en *cis*, u oligómero de estas secuencias, se usa en ensayos de hibridación de otros tejidos vegetales para identificar genes homólogos o cercanamente relacionados y secuencias reguladoras asociadas. Estos incluyen pero sin limitación ensayos de hibridación de Southern o northern en cualquier sustrato incluyendo pero sin limitación un tejido vegetal preparado de forma apropiada, celulosa, nylon o filtro de combinación, microplaca o portaobjetos de vidrio. Dichas metodologías se conocen bien en la técnica y están disponibles en un kit o preparación que puede proporcionarse por proveedores comerciales.

Un fragmento de un ácido nucleico como se usa en el presente documento es una parte del ácido nucleico que es menor de longitud completa. Por ejemplo, para la presente invención cualquier longitud de secuencia de nucleótidos que sea menor que las secuencias de nucleótidos desveladas de SEC ID N°: 12, se considera un fragmento. Un fragmento también puede comprender al menos una longitud mínima capaz de hibridar específicamente con un ácido nucleico nativo en condiciones de hibridación rigurosas como se han definido anteriormente. La longitud de un fragmento mínimo tal es preferentemente de al menos 8 nucleótidos, más preferentemente 15 nucleótidos, incluso más preferentemente al menos 20 nucleótidos, y más preferentemente al menos 30 nucleótidos de una secuencia de ácido nucleico nativa.

60 Una "sonda" es un ácido nucleico aislado al que se une un marcador detectable convencional o molécula iniciadora, por ejemplo, un isótopo radiactivo, ligando, agente quimioluminiscente o enzima. Los "cebadores" son ácidos nucleicos aislados que hibridan con una cadena de ADN diana complementaria por hibridación de ácido

nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN diana, después se extiende a lo largo de la cadena de ADN diana por una polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa. Pueden usarse pares de cebadores para amplificación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico convencionales.

- 5 Las sondas y los cebadores son generalmente de 11 nucleótidos o más de longitud, preferentemente 18 nucleótidos o más, más preferentemente 25 nucleótidos y más preferentemente 30 nucleótidos o más. Tales sondas y cebadores hibridan específicamente con una secuencia de ADN o ARN diana en condiciones de hibridación de alta rigurosidad e hibridan específicamente con una secuencia nativa diana de otra especie en condiciones de rigurosidad más baja. Preferentemente, las sondas y los cebadores de acuerdo con la presente invención tienen similitud de secuencia completa con la secuencia nativa, aunque pueden diseñarse sondas que difieran de la secuencia nativa y que conserven la capacidad para hibridar con las secuencias nativas diana por procedimientos convencionales. Se describen procedimientos para preparar y usar sondas y cebadores, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (en lo sucesivo en el presente documento "Sambrook y col., 1989"); *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel y col., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) (en lo sucesivo en el presente documento, "Ausubel y col., 1992"); e Innis y col., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press: San Diego, 1990. Pueden derivarse pares de cebadores de PCR de una secuencia conocida, por ejemplo, mediante el uso de programas informáticos pretendidos para ese fin tales como Primer (Versión 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA). Pueden usarse cebadores y sondas basados en las secuencias promotoras nativas desveladas en el presente documento para confirmar y, si es necesario, modificar las secuencias desveladas por procedimientos convencionales, por ejemplo, volviendo a clonar y volviendo a secuenciar.

### Construcciones y Construcciones de Expresión

25 Pueden incorporarse ácidos nucleicos nativos o sintéticos de acuerdo con la presente invención en construcciones de ácidos nucleicos recombinantes, normalmente construcciones de ADN, capaces de introducción y replicación en una célula huésped. En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos de la presente invención como se muestra en la SEC ID N°: 28 se incorpora en un casete de expresión que incluye las regiones promotoras de la presente invención unidas operativamente con un componente genético tal como gen marcador seleccionable, explorable o puntuable.

30 En otra realización, las secuencias de ácido nucleico desveladas de la presente invención como se muestran en SEC ID N°: 28, se unen operativamente con un componente genético tal como un ácido nucleico que confiere una característica deseable asociada con morfología, fisiología, crecimiento y desarrollo de plantas, rendimiento, potenciación nutricional, resistencia a enfermedad o plaga, o tolerancia ambiental o química. Estos componentes genéticos tales como genes marcadores o genes agrónomos de interés pueden actuar en la identificación de una célula vegetal o planta transformada o producir un producto de utilidad agrónoma.

35 En otra realización, un componente genético produce un producto que actúa como un dispositivo de selección y actúa en un tejido vegetal regenerable para producir un compuesto que conferiría al tejido vegetal resistencia a un compuesto de otro modo tóxico. Los genes de interés para su uso como un marcador seleccionable, explorable o puntuable incluirían pero sin limitación GUS (secuencia codificante de beta-glucuronidasa), GFP (secuencia codificante de proteína verde fluorescente), LUX (gen codificante de luciferasa), genes marcadores de resistencia a antibióticos o genes de tolerancia a herbicidas. Los ejemplos de transposones y genes de resistencia a antibióticos asociados incluyen los transposones Tns (bla), Tn5 (nptII), Tn7 (dhfr), penicilinas, kanamicina (y neomicina, G418, bleomicina); metotrexato (y trimetoprim); cloranfenicol; kanamicina y tetraciclina.

45 Se han perfilado características útiles para marcadores seleccionables en plantas en un informe sobre el uso de microorganismos (Comité Consultivo sobre Nuevos Alimentos y Procedimientos, julio de 1994). Estas incluyen selección rigurosa con número mínimo de tejidos no transformados, grandes números de acontecimientos de transformación independientes sin interferencia significativa con la regeneración, aplicación a un gran número de especies y disponibilidad de un ensayo para puntuar los tejidos con respecto a presencia del marcador.

50 Se conocen en la técnica varios genes marcadores seleccionables y varios marcadores de resistencia a antibióticos satisfacen estos criterios, incluyendo los resistentes a kanamicina (nptII), higromicina B (aph IV) y gentamicina (aac3 y aacC4). Los genes marcadores seleccionables dominantes útiles incluyen genes que codifican genes de resistencia a antibióticos (por ejemplo, resistencia a higromicina, kanamicina, bleomicina, G418, estreptomina o espectinomicina); y genes de resistencia a herbicidas (por ejemplo, fosfinotricin acetiltransferasa). Una estrategia útil para selección de transformantes para resistencia a herbicida se describe, por ejemplo, en Vasil, *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vols. I-III, Laboratory Procedures and Their Applications Academic Press, Nueva York, 1984. Serían genes marcadores seleccionables particularmente preferidos para su uso en la presente invención genes que confieran resistencia a compuestos tales como antibióticos como kanamicina, y herbicidas como glifosato (Della-Cioppa y col., *Bio/Technology* 5(6), 1987, Patente de Estados Unidos 5.463.175, Patente de Estados Unidos 5.633.435). Pueden implementarse también otros dispositivos de selección y aun quedarían dentro del alcance de la presente invención.

Para la práctica de la presente invención, se emplean composiciones y procedimientos convencionales para preparar y usar construcciones de ADN y células hospedadoras, como se analiza, entre otros, en Sambrook y col., 1989. En una realización preferida, la célula huésped es una célula vegetal. Se han descrito varias construcciones de ADN adecuadas para transfección estable de células vegetales o para el establecimiento de plantas transgénicas en, por ejemplo, Pouwels y col., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985, sup. 1987; Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989; Gelvin y col., *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, 1990 y R.R.D. Croy *Plant Molecular Biology LabFax*, BIOS Scientific Publishers, 1993. Las construcciones de expresión en plantas pueden incluir, por ejemplo, uno o más genes vegetales clonados bajo el control transcripcional de secuencias reguladoras 5' y 3'. También pueden incluir un marcador seleccionable como se describe para seleccionar células huésped que contienen la construcción de expresión. Tales construcciones de expresión en plantas también contienen una región reguladora del promotor (por ejemplo, una región reguladora que controla expresión inducible o constitutiva, regulada ambientalmente o por desarrollo o específica de célula o tejido), un sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma, una señal de procesamiento de ARN, un sitio de terminación de la transcripción y una señal de poliadenilación. Otras secuencias de origen bacteriano también se incluyen para permitir que la construcción se clone en un huésped bacteriano. La construcción normalmente también contendrá un origen de replicación procariota de serie de huéspedes amplia. En una realización particularmente preferida, la célula huésped es una célula vegetal y la construcción de expresión en plantas comprende una región promotora como se desvela en SEC ID N°: 28; una secuencia transcribible unida operativamente; y una secuencia de terminación de la transcripción. Otras secuencias reguladoras previstas como componentes genéticos en una construcción de expresión incluyen pero sin limitación secuencia líder no traducida que puede acoplarse con el promotor. En una realización particularmente preferida, la célula huésped es una célula vegetal y la construcción de expresión en plantas comprende una región promotora como se desvela en SEC ID N°: 28, una secuencia transcribible unida operativamente y una secuencia de terminación de la transcripción. Las construcciones de expresión en plantas también pueden comprender secuencias adicionales que incluyen pero sin limitación secuencias de poliligador que contienen sitios de enzimas de restricción que son útiles para fines de clonación.

#### Elementos Genéticos en Construcciones de Expresión en Plantas

Las construcciones de expresión en plantas pueden incluir más de una secuencia génica expresable, cada una unida operativamente a un promotor diferente. Varios promotores tienen utilidad para expresión de genes en plantas para cualquier gen de interés incluyendo pero sin limitación marcadores seleccionables, marcadores puntuables, genes para tolerancia a plagas, tolerancia a enfermedad, potenciaciones nutricionales y cualquier otro gen de interés agrónomo. Los ejemplos de promotores constitutivos útiles para expresión de genes en plantas incluyen pero sin limitación, promotor P-35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), que confiere expresión de alto nivel constitutiva en la mayoría de los tejidos vegetales (véase, por ejemplo, Odel y col., *Nature* 313: 810, 1985), incluyendo monocotiledóneas (véase, por ejemplo, Dekeyser y col., *Plant Cell* 2: 591, 1990; Terada y Shimamoto, *Mol. Gen. Genet.* 220: 389, 1990); un promotor 35S potenciado (P-e35S) que comprende una secuencia potenciadora 35S de CaMV duplicada en tándem; el promotor de nopalina sintasa (An y col., *Plant Physiol.* 88: 547, 1988); el promotor de octopina sintasa (Fromm y col., *Plant Cell* 1: 977, 1989); y el promotor del virus del mosaico de la escrofularia (P-FMV) como se describe en la Patente de Estados Unidos N°: 5.378.619 y una versión potenciada (P-eFMV) derivada de la secuencia promotora de P-FMV; el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor; un promotor del virus baciliforme de la caña de azúcar; un promotor del virus de manchas amarillas de commelina; y otros promotores de virus de ADN de plantas que se sabe que se expresan en células vegetales.

Puede usarse varios promotores de genes vegetales que se regulan en respuesta a señales ambientales, hormonales, químicas y/o de desarrollo para la expresión de un gen unido operativamente en células vegetales, incluyendo promotores regulados por (1) calor (Callis y col., *Plant Physiol.* 88: 965, 1988), (2) luz (por ejemplo, promotor rbcS-3A de guisante, Kuhlemeier y col., *Plant Cell* 1: 471, 1989; promotor rbcS del maíz, Schaffner y Sheen, *Plant Cell* 3: 997, 1991; o promotor de la proteína de unión a clorofila a/b, Simpson y col., *EMBO J.* 4: 2723, 1985), (3) hormonas, tales como ácido abscísico (Marcotte y col., *Plant Cell* 1: 969, 1989), (4) heridas (por ejemplo, wunl, Siebertz y col., *Plant Cell* 1: 961, 1989); o (5) compuestos químicos tales como metil jasmonato, ácido salicílico o protector. También puede ser ventajoso emplear (6) promotores específicos de órganos (por ejemplo, Roshal y col., *EMBO J.* 6: 1155, 1987; Schernthaner y col., *EMBO J.* 7: 1249, 1988; Bustos y col., *Plant Cell* 1: 839, 1989).

Los promotores de la presente invención son promotores vegetales que son capaces de transcribir secuencias de ADN unidas operativamente en tejido del meristemo que crece rápidamente y tejidos reproductivos y pueden unirse operativamente a cualquier gen de interés en una construcción de expresión.

Las construcciones de expresión de plantas pueden incluir señales de procesamiento de ARN, por ejemplo, intrones, que pueden situarse cadena arriba o cadena abajo de una secuencia codificante de polipéptidos en el transgén. Además, las construcciones de expresión pueden incluir secuencias reguladoras adicionales de la región no traducida 3' de genes de plantas (Thomburg y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 744 (1987); An y col., *Plant Cell* 1: 115 (1989), por ejemplo, una región terminadora 3' para aumentar la estabilidad del ARNm, tal como la región terminadora PI-II de patata o las regiones terminadoras 3' de octopina o nopalina sintasa. Las regiones no traducidas 5' de un ARNm pueden desempeñar un papel importante en el inicio de la traducción y también pueden ser un componente genético en una construcción de expresión en plantas. Por ejemplo, las secuencias líder 5' no traducidas derivadas de genes de proteínas de choque térmico han demostrado potenciar la expresión génica en

plantas (véase, por ejemplo Patente de Estados Unidos 5.362.865). Estas secuencias reguladoras cadena arriba y cadena abajo adicionales pueden derivar de una fuente que es nativa o heteróloga con respecto a los otros elementos presente en la construcción de expresión.

Las secuencias promotoras de la presente invención se usan para controlar la expresión génica en células vegetales. Las secuencias promotoras desveladas son componentes genéticos que son parte de construcciones usadas en transformación de plantas. Las secuencias promotoras de la presente invención pueden usarse con cualquier plásmido o construcción de transformación de plantas adecuado que contenga un marcador seleccionable o explorable y elementos reguladores asociados, como se describe, junto con uno o más ácidos nucleicos expresados de una manera suficiente para conferir un rasgo deseable particular. Los ejemplos de genes estructurales adecuados de interés agrónomo previstos por la presente invención incluirían pero sin limitación uno o más genes de tolerancia a insectos, tales como un gen de *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*), tolerancia a plagas tales como genes para control de enfermedad fúngica, tolerancia a herbicida tal como genes que confieren tolerancia a glifosato, y genes para mejoras de calidad tales como rendimiento, mejoras nutricionales, tolerancias ambientales o a estrés, o cualquier cambio deseable en la fisiología, crecimiento, desarrollo, morfología vegetal o el producto o productos vegetales. Por ejemplo, los genes estructurales incluirían cualquier gen que confiera tolerancia a insectos incluyendo pero sin limitación un gen de proteína de combate de insectos de *Bacillus* como se describe en el documento WO 9931248, Patente de Estados Unidos N°: 5.689.052, Patentes de Estados Unidos N°: 5.500.365 y 5.880.275. En otra realización, el gen estructural puede conferir tolerancia al herbicida glifosato como se confiere por genes que incluyen, pero sin limitación gen de EPSPS resistente a glifosato de *Agrobacterium* cepa CP4 (*aroA*:CP4) como se describe en la Patente de Estados Unidos N°: 5.633.435, o gen de glifosato oxidoreductasa (GOX) como se describe en la Patente de Estados Unidos N°: 5.463.175.

Como alternativa, las secuencias codificantes de ADN pueden efectuar estos fenotipos codificando una molécula de ARN no traducible que provoca la inhibición dirigida de expresión de un gen endógeno, por ejemplo mediante mecanismos mediados por antisentido o cosupresión (véase, por ejemplo, Bird y col., *Biotech. Gen. Engin. Rev.* 9: 207,1991). El ARN también podría ser una molécula de ARN catalítica (es decir, una ribozima) modificada por ingeniería genética para escindir un producto de ARNm endógeno deseado (véase por ejemplo, Gibson y Shillitoe, *Mol. Biotech.* 7: 125,1997). Por lo tanto, cualquier gen que produzca una proteína o ARNm que exprese un fenotipo o cambio de morfología de interés es útil para la práctica de la presente invención.

Además de elementos reguladores o secuencias localizadas cadena arriba (5') o dentro de una secuencia de ADN, existen secuencias cadena abajo (3') que afectan a la expresión génica. Por lo tanto, la expresión secuencia reguladora como se usa en el presente documento se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos localizada cadena arriba, dentro, o cadena abajo de una secuencia de ADN que controla, media en o afecta a la expresión de un producto génico junto con el aparato sintético proteico de la célula.

Los expertos en la materia conocen las construcciones adecuadas para la transformación de plantas. Las secuencias promotoras de la presente invención se incorporan preferentemente en una construcción de expresión usando marcadores explorables o puntuables como se ha descrito y se ensayan en análisis transitorios para proporcionar un indicio de la expresión génica en plantas transformadas. Se conocen procedimientos para ensayar la expresión génica en ensayos transitorios por los expertos en la materia. Se ha indicado expresión transitoria de genes marcadores usando varias plantas, tejidos y sistemas de suministro de ADN. Por ejemplo, los tipos de análisis transitorios pueden incluir pero sin limitación dirigir el suministro génico mediante electroporación o bombardeo de partículas de tejidos en cualquier ensayo de planta transitorio usando cualquier especie vegetal de interés. Tales sistemas transitorios incluirían pero sin limitación protoplastos de cultivos en suspensión en trigo (Zhou y col., *Plant Cell Reports* 12: 612. 1993), electroporación de protoplastos de hoja de trigo (Sethi y col., *J. Crop Sci.* 52: 152, 1983); electroporación de protoplasto preparado a partir de tejido de maíz (Sheen, *J. The Plant Cell* 3: 225, 1991) o bombardeo de partículas de tejidos específicos de interés. La presente invención abarca el uso de cualquier sistema de expresión transitorio para evaluar secuencias reguladoras unidas operativamente a genes indicadores seleccionados, genes marcadores o genes agrónomos de interés. Los ejemplos de tejidos vegetales que se ha previsto ensayar en transitorios mediante un sistema de suministro apropiado incluirían pero sin limitación tejidos de base de las hojas, callos, cotiledones, raíces, endospermos, embriones, tejido floral, polen y tejido epidérmico.

Puede usarse cualquier marcador puntuable o explorable en un ensayo transitorio. Los genes marcadores preferidos para análisis transitorios de los promotores de secuencias reguladoras 5' de la presente invención incluyen un gen de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) o un gen de proteína verde fluorescente (GFP). Las construcciones de expresión que contienen las secuencias reguladoras 5' unidas operativamente a un gen marcador se suministran a los tejidos y los tejidos se analizan por el mecanismo apropiado, dependiendo del marcador. Los análisis cuantitativos o cualitativos se usan como una herramienta para evaluar el perfil de expresión potencial de las secuencias reguladoras 5' cuando se unen operativamente a genes de interés agrónomo en plantas estables. En última instancia, las secuencias reguladoras 5' de la presente invención se incorporan directamente en construcciones de expresión de transformación de plantas adecuadas que comprenden las secuencias reguladoras 5' unidas operativamente a una secuencia de ADN transcribible de interés, se transforman en plantas y las plantas transformadas de forma estable y descendencia de las mismas se analizan con respecto al perfil de expresión deseado conferido por las secuencias reguladoras 5'.

Las construcciones de expresión adecuadas para introducir ADN exógeno en células vegetales incluirían pero sin limitación plásmidos Ti desarmados para procedimientos mediados por *Agrobacterium*. Estas construcciones pueden contener un marcador de resistencia, límites de ADN T 1-2 y orígenes de replicación para *E. coli* y *Agrobacterium* junto con uno o más genes de interés y regiones reguladoras asociadas. Los expertos en la materia saben que están disponibles para enfoques mediados por *Agrobacterium* varias cepas y procedimientos. Tales cepas incluirían pero sin limitación cepas de *Agrobacterium* C58, LBA4404, EHA101 y EHA105. Son cepas particularmente preferidas las cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.

Ácidos nucleicos a modo de ejemplo que pueden introducirse por los procedimientos abarcados por la presente invención incluyen, por ejemplo, secuencias de ADN o genes de otras especies, o incluso genes o secuencias que se originan con o están presentes en la misma especie, pero se incorporan en células receptoras por procedimientos de ingeniería genética en vez de técnicas de reproducción o cultivo clásicas. Sin embargo, el término "exógeno" también pretende referirse a genes que normalmente no están presentes en la célula que se transforma, o quizá simplemente no están presentes en la forma, estructura, etc., como se haya en el segmento de ADN transformante o gen o genes que normalmente están presentes y que se desea expresar de una manera que difiere del patrón de expresión natural, por ejemplo, sobreexpresar. Por lo tanto, el término gen "exógeno" o ADN pretende referirse a cualquier gen o segmento de ADN que se introduce en una célula receptora, independientemente de si un gen similar ya está presente en una célula tal. El tipo de ADN incluido en el ADN exógeno puede incluir ADN que ya está presente en la célula vegetal, ADN de otra planta, ADN de un organismo diferente o un ADN generado de forma externa, tal como secuencia de ADN que contiene un mensaje antisentido de un gen, o una secuencia de ADN que codifica una versión sintética o modificada de un gen.

Las construcciones de transformación de plantas que contienen las secuencias promotoras de la presente invención pueden introducirse en plantas por cualquier procedimiento de transformación de plantas. Están disponibles varios procedimientos para introducir secuencias de ADN en células vegetales y se conocen bien en la técnica. Los procedimientos adecuados incluyen pero sin limitación infección bacteriana (por ejemplo, con *Agrobacterium* como se ha descrito anteriormente), construcciones de cromosoma artificial de bacterias binarios, suministro directo de ADN (por ejemplo, mediante transformación mediada por PEG, captación de ADN mediada por desecación/inhibición, electroporación, agitación con fibras de carburo de silicio), y aceleración de partículas revestidas con ADN (revisado en Potrykus, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 42: 205, 1991).

Los procedimientos para transformar específicamente dicotiledóneas usan principalmente *Agrobacterium tumefaciens*. Por ejemplo, las plantas transgénicas indicadas incluyen pero sin limitación algodón (Patente de Estados Unidos N° 5.004.863; Patente de Estados Unidos N° 5.159.135; Patente de Estados Unidos N° 5.518.908, documento WO 97/43430), soja (Patente de Estados Unidos N° 5.569.834; Patente de Estados Unidos N° 5.416.011; McCabe y col., Bio/Technology, 6:923, 1988; Christou y col., Plant Physiol., 87:671, 1988); Brassica (Patente de Estados Unidos N° 5.463.174), y cacahuete (Cheng y col., Plant Cell Rep., 15: 653, 1996).

Se han presentado procedimientos similares en la transformación de monocotiledóneas. La retransformación y regeneración de plantas usando estos procedimientos se ha descrito para varios cultivos incluyendo pero sin limitación espárragos (*Asparagus officinalis*; Bytebier y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84: 5345, 1987); cebada (*Hordeum vulgare*; Wan y Lemaux, Plant Physiol., 104: 37, 1994); maíz (*Zea mays*; Rhodes, C.A., y col., Science, 240: 204, 1988; Gordon-Kamm, y col., Plant Cell, 2: 603, 1990; Fromm, y col., Bio/Technology, 8: 833, 1990; Koziel, y col., Bio/Technology, 11: 194, 1993); avena (*Avena sativa*; Somers, y col., Bio/Technology, 10: 1589, 1992); *Dactylis (Dactylis glomerata*; Horn, y col., Plant Cell Rep., 7: 469, 1988); arroz (*Oryza sativa*, incluyendo variedades india y japónica, Toriyama, y col., Bio/Technology, 6: 10, 1988; Zhang, y col., Plant Cell Rep., 7: 379, 1988; Luo y Wu, Plant Mol. Biol. Rep., 6: 165, 1988; Zhang y Wu, Theor. Appl. Genet., 76: 835, 1988; Christou, y col., Bio/Technology, 9: 957, 1991); sorgo (*Sorghum bicolor*; Casas, A.M., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90: 11212, 1993); caña de azúcar (*Saccharum spp.*; Bower y Birch, Plant J., 2: 409, 1992); festuca alta (*Festuca arundinacea*; Wang, Z.Y. y col., Bio/Technology, 10: 691, 1992); césped (*Agrostis palustris*; Zhong y col., Plant Cell Rep., 13: 1, 1993); trigo (*Triticum aestivum*; Vasil y col., Bio/Technology, 10: 667, 1992; Weeks T., y col., Plant Physiol., 102: 1077, 1993; Becker, y col., Plant, J. 5: 299, 1994), y alfalfa (Masoud, S.A., y col., Transgen. Res., 5: 313, 1996). Resulta evidente para los expertos en la materia que pueden usarse varias metodologías de transformación para producción de plantas transgénicas estables de cualquier variedad de cultivos diana de interés.

#### Procedimientos de análisis de plantas

Las plantas transformadas se analizan con respecto a la presencia de los genes de interés y el nivel de expresión y/o perfil conferido por las secuencias promotoras de la presente invención. Los expertos en la materia conocen numerosos procedimientos disponibles para análisis de plantas transformadas. Se usan varios procedimientos para evaluar la expresión génica y determinar si el gen o los genes introducidos se integran, actúan de forma apropiada y se heredan como se esperaba. Para la presente invención los promotores pueden evaluarse determinando los niveles de expresión de genes con los que se unen operativamente los promotores. Una evaluación preliminar de la función promotora puede determinarse por un procedimiento de ensayo transitorio usando genes indicadores, pero una evaluación promotora más definitiva puede determinarse a partir del análisis de plantas estables. Los procedimientos para análisis de plantas incluyen pero sin limitación transferencias de Southern o transferencias de Northern, enfoques basados en PCR, análisis bioquímicos, procedimientos de exploración fenotípicos, evaluaciones

de campo y ensayos inmunodiagnósticos.

Los procedimientos de la presente invención incluyen pero sin limitación tecnologías de PCR, aislamiento de ADN genómico, construcción de una construcción de expresión, ensayos transitorios y se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos de transformación de plantas y se llevan a cabo usando técnicas convencionales o modificaciones de las mismas.

### Ensayos de pulverización de glifosato

En una realización se lleva a cabo una evaluación de invernadero o de campo con respecto a la tolerancia de glifosato. El término "glifosato" se usa en el presente documento para referirse colectivamente al herbicida parental N-fosfonometilglicina (conocido de otro modo como ácido de glifosato), a una sal o éster del mismo, o a un compuesto que se convierte a N-fosfonometilglicina en tejidos vegetales o que proporciona de otro modo N-fosfonometilglicina en forma iónica (conocido de otro modo como ión glifosato). De forma ilustrativa, se desvelan sales de glifosato solubles en agua útiles en el presente documento en las Patentes de Estados Unidos N° 3.799.758 y N° 4.405.531 de Franz, la divulgación de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Las sales de glifosato que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen pero sin restricción metales alcalinos, por ejemplo sodio y potasio, sales; sal de amonio; sales de C<sub>1-16</sub> alquilamonio, por ejemplo dimetilamonio e isopropilamonio; sal de C<sub>1-16</sub> alcanolamonio, por ejemplo monoetanolamonio; sales de C<sub>1-16</sub> alquilsulfonio, por ejemplo trimetilsulfonio; mezclas de los mismos y similares. La molécula de ácido de glifosato tiene tres sitios ácidos que tienen diferentes valores de pKa; en consecuencia pueden usarse sales mono, di y tribásicas o cualquier mezcla de las mismas, o sales de cualquier nivel intermedio de neutralización.

Las sales de glifosato son significativas comercialmente en parte debido a que son solubles en agua. Muchas sales de amonio, alquilamonio, alcanolamonio, alquilsulfonio y metales alcalinos son altamente solubles en agua, lo que permite su formulación como soluciones acuosas altamente concentradas que pueden diluirse en agua en el punto de uso.

Dichas soluciones acuosas concentradas pueden contener de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 g por litro de glifosato, expresado como equivalente de ácido (g e.a./l). Se prefieren mayores concentraciones de glifosato, por ejemplo de aproximadamente 300 a aproximadamente 500 g e.a/l.

Las sales de glifosato se formulan de manera alternativa como composiciones solubles en agua o dispersables en agua, por ejemplo, en forma de polvos, gránulos, granza o comprimidos. Tales composiciones se conocen frecuentemente como formulaciones en seco, aunque el término "seco" no debe entenderse en este contexto que implique la ausencia completa de agua. Normalmente, las formulaciones en seco contienen menos de aproximadamente el 5 % en peso de agua, por ejemplo de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 2 % en peso de agua. Tales formulaciones están destinadas para la disolución o dispersión en agua en el momento del uso.

Las formulaciones de glifosato en seco contempladas pueden contener de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 80 % en peso de glifosato, expresado como equivalente de ácido (porcentaje de e.a.). Se prefieren mayores concentraciones de glifosato dentro del intervalo anterior, por ejemplo de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 80 % e.a. Las sales de glifosato especialmente útiles para fabricar formulaciones en seco son las sales de sodio y de amonio.

Las composiciones para el tratamiento de plantas y las composiciones de concentrado líquido y seco de la presente invención pueden contener opcionalmente uno o más principios de excipientes deseados. Los principios excipientes especialmente útiles para las composiciones de glifosato son tensioactivos, que ayudan a retener las soluciones de pulverización acuosas en las superficies relativamente hidrófobas de las hojas de las plantas, así como ayudar al glifosato a penetrar en la capa externa cerosa (cutícula) de la hoja y por lo tanto ponerse en contacto con los tejidos vivos dentro de la hoja. Los tensioactivos también pueden realizar otras funciones útiles.

No existe limitación en cuanto al tipo o clase química de tensioactivo que puede usarse en las composiciones de glifosato de la presente invención. En situaciones particulares, son del todo útiles los tipos no iónicos, aniónicos, catiónicos y anfotéricos, o combinaciones de más de uno de estos tipos. Sin embargo, generalmente se prefiere que al menos uno de los tensioactivos presente, si hubiese alguno, deba ser distinto de aniónico, es decir, al menos uno de los tensioactivos debe ser no iónico, catiónico o anfotérico.

Muchos tensioactivos útiles en el presente documento tienen una estructura química que comprende uno o más restos consistiendo cada uno en una sola unidad de óxido de alquileo C<sub>2-4</sub> o una cadena polimerizada o copolimerizada de unidades de óxido de alquileo C<sub>2-4</sub>. Tales tensioactivos se denominan tensioactivos de polioxilalquileo e incluyen tipos anfotéricos no iónicos, aniónicos y catiónicos. Los tensioactivos de polioxilalquileo útiles en las composiciones contempladas en la presente invención contienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 unidades de óxido de alquileo C<sub>2-4</sub>. En los tensioactivos de polioxilalquileo preferidos las unidades de óxido de alquileo forman una o más cadenas de óxido de etileno o de óxido de etileno y de óxido de propileno copolimerizado, teniendo cada cadena de óxido de alquileo unidades que tienen un grupo hidrido terminal o una terminación con protección alquilo C<sub>1-4</sub> o alcanilo C<sub>1-4</sub>.

Los restos hidrófobos de los tensioactivos útiles en las composiciones de la presente invención pueden basarse esencialmente en hidrocarburo, en cuyo caso los restos hidrófobos son normalmente cadenas de alquilo, alquenilo, alquilarilo, alcanilo o alquenoilo C<sub>8-24</sub>, preferentemente C<sub>12-18</sub>. Estas cadenas pueden ser lineales o ramificadas. Como alternativa, los restos hidrófobos pueden contener átomos de silicio, por ejemplo en forma de grupos siloxano tales como grupos heptametiltrisiloxano, o átomos de flúor, por ejemplo, como cadenas de alquilo o perfluoroalquilo parcialmente fluoradas.

Entre los tensioactivos no iónicos, las clases especialmente preferidas incluyen éteres de polioxietileno de alquilo, alquenilo o alquilarilo, tales como alcoholes primarios o secundarios etoxilados o alquilfenoles, ésteres de polioxietileno de alquilo o alquenilo, tales como ácidos grasos etoxilados, ésteres de polioxietileno sorbitán alquilo sorbitan, ésteres de gliceril alquilo, ésteres de sacarosa, alquil poliglucósidos y similares. Los ejemplos específicos representativos de tales tensioactivos no iónicos incluyen polioxietilén (9) nonilfenol, Neodol™ 25-7 de Shell (un alcohol primario lineal C<sub>12-15</sub> de polioxietileno (7)), Tergitol™ 15-S-9 de Union Carbide (un alcohol secundario C<sub>12-15</sub> de polioxietileno (9)), Tween™ 20 de ICI (un monolaurato de polioxietileno de sorbitan (20)) y Agrimul™ PG-2069 de Henkel (un alquil poliglucósido C<sub>9-11</sub>).

Entre los tensioactivos catiónicos, las clases especialmente preferidas incluyen alquilaminas o alquenilaminas terciarias de polioxietileno, tales como aminas grasas etoxiladas, tensioactivos de amonio cuaternario, alquileteraminas de polioxietileno, y similares. Los ejemplos específicos representativos de tales tensioactivos catiónicos incluyen polioxietilén (5) cocoamina, polioxietilén (15) seboamina, cloruro de diestearildimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de metil bis (2-hidroxietil)cocoamonio, cloruro de N-dodecilpiridina y cloruro de polioxipropilén (8) etoxitrimetilamonio. Las polioxietilén alquileteraminas particularmente preferidas son las descritas en la Publicación PCT N° WO 96/32839. En la técnica se conocen muchos tensioactivos de amonio cuaternario catiónicos de diversas estructuras que son útiles en combinación con glifosato y que pueden usarse en las composiciones contempladas en el presente documento; tales tensioactivos de amonio cuaternario tienen la fórmula



en la que A es un anión adecuado tal como cloro, bromo, iodo, acetato, sulfato o fosfato, m y n son números enteros de tal manera que las cargas eléctricas positivas sobre los cationes (NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>R<sup>c</sup>R<sup>d</sup>) equilibran las cargas eléctricas negativas sobre los aniones A, y las opciones para R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup> y R<sup>d</sup> incluyen, sin limitación:

(i) R<sup>a</sup> es bencilo o alquilo o alquenilo C<sub>8-24</sub>, preferentemente C<sub>12-18</sub> y R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup> y R<sup>d</sup> son independientemente alquilo C<sub>1-4</sub>, preferentemente metilo;

(ii) R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente alquilo o alquenilo C<sub>8-24</sub>, preferentemente C<sub>12-18</sub>, y R<sup>c</sup> y R<sup>d</sup> son independientemente alquilo C<sub>1-4</sub>, preferentemente metilo;

(iii) R<sup>a</sup> es alquilo o alquenilo C<sub>8-24</sub>, preferentemente C<sub>12-18</sub>, R<sup>b</sup> es una cadena de polioxialquileno que tiene aproximadamente de 2 a aproximadamente 100 unidades de óxido de alquileno C<sub>2-4</sub>, preferentemente unidades de óxido de etileno, y R<sup>c</sup> y R<sup>d</sup> son independientemente alquilo C<sub>1-4</sub>, preferentemente metilo;

(iv) R<sup>a</sup> es alquilo o alquenilo C<sub>8-24</sub>, preferentemente C<sub>12-18</sub>, R<sup>b</sup> y R<sup>c</sup> son cadenas de polioxialquileno que tiene en total de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 unidades de óxido de alquileno C<sub>2-4</sub>, preferentemente unidades de óxido de etileno, y R<sup>d</sup> es alquilo C<sub>1-4</sub>, preferentemente metilo; o

(v) R<sup>a</sup> es una cadena de polioxialquileno que tiene de aproximadamente de 2 a aproximadamente 100 unidades de óxido de alquileno C<sub>2-4</sub>, en la que predominan las unidades de óxido de alquileno C<sub>3-4</sub>, preferentemente unidades de óxido de propileno y R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup> y R<sup>d</sup> son independientemente alquilo C<sub>1-4</sub>, preferentemente metilo o etilo. Los tensioactivos de amonio cuaternario de este tipo particularmente preferidos son los desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 5.464.807 de Claude y col.

En una realización, el anión A asociado con dicho tensioactivo de amonio cuaternario puede ser un anión de glifosato.

Entre los tensioactivos anfotéricos, incluyendo como es habitual en la técnica los tensioactivos más debidamente descritos como zwitteriónicos, clases especialmente preferidas incluye óxidos de polioxietilén alquilamina, alquilbetainas, aminoácidos sustituidos con alquilo y similares. Los ejemplos representativos de tales tensioactivos anfotéricos incluyen óxido de dodecildimetilamina, óxido de polioxietilén (2) cocoamina y estearildimetilbetaina.

Las fuentes de referencia convencionales a partir de las cuales un experto en la materia puede seleccionar tensioactivos adecuados, sin limitación con respecto a las clases mencionadas anteriormente, incluyen los documentos Handbook of Industrial Surfactants, Segunda Edición (1997) publicado por Gower, McCutcheon's Emulsifiers and Detergents, North American and International Editions (1997) publicado por MC Publishing Company, e International Cosmetic Ingredient Dictionary, Sexta Edición (1995) Volúmenes 1 y 2, publicado por the Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association.

Otros componentes opcionales de las composiciones de la presente invención incluyen agentes para modificar características de color, viscosidad, de gelificación, punto de congelación, higroscopía, comportamiento de apelmazamiento, velocidad de disolución, dispersibilidad u otras características de la formulación.

Ejemplos de formulaciones de glifosato comerciales incluyen, sin limitación, las comercializadas por Monsanto Company como herbicidas ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® CT, ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK® y ACCORD®, todas ellas conteniendo glifosato como su sal de isopropilamonio; las comercializadas por Monsanto Company como herbicidas ROUNDUP® DRY y RIVAL®, que contienen glifosato como su sal de amonio; las comercializadas por Monsanto Company como ROUNDUP® GEOFORCE, que contienen glifosato como su sal de sodio y la que comercializa Zeneca Limited como herbicida TOUCHDOWN®, que contiene glifosato como su sal trimetilsulfonio.

La selección de las tasas de aplicación para una formulación de glifosato que sea biológicamente eficaz se encuentra dentro de la competencia de la técnica agrícola habitual. Un experto en la materia probablemente reconocerá qué condiciones individuales de la planta, condiciones climatológicas y condiciones de cultivo pueden influir en los resultados conseguidos en la realización práctica del proceso de la presente invención. Durante dos décadas del uso de glifosato y estudios publicados relacionados con dicho uso han proporcionado información abundante a partir de la cual un buen profesional del control de maleza puede seleccionar las tasas de aplicación de glifosato que sean eficaces desde el punto de vista herbicida sobre especies particulares en fases de crecimiento particulares en condiciones de entorno particulares.

Un proceso de la presente invención puede aplicarse a cualquiera y a todas las especies vegetales en las que el glifosato es biológicamente eficaz como un herbicida o como un regulador del crecimiento de las plantas. Esto incluye una variedad muy amplia de especies vegetales en todo el mundo. Del mismo modo, las composiciones de la invención pueden aplicarse a cualquiera y a todas las especies vegetales en las que el glifosato es biológicamente eficaz.

En una realización, a la planta que comprende las construcciones de ADN de la presente invención se le aplica un herbicida que contiene glifosato y las plantas se evalúan para determinar la tolerancia al herbicida de glifosato. Para someter a ensayo las plantas que comprenden las construcciones de ADN de la presente invención puede usarse cualquier formulación de glifosato. Por ejemplo, puede usarse una composición de glifosato tal como Roundup Ultra™. Los parámetros de ensayo para realizar una evaluación de la planta de la tolerancia a glifosato variarán dependiendo de diversos factores. Los factores incluirían, pero sin limitación, el tipo de formulación de glifosato, la concentración y la cantidad de glifosato usada en la formulación, el tipo de planta, la fase de desarrollo de la planta durante el tiempo de la aplicación, las condiciones ambientales, el procedimiento de aplicación y del número de veces en los que se aplica una formulación particular. Por ejemplo, las plantas pueden someterse a ensayo en un entorno de invernadero usando un procedimiento de aplicación mediante pulverizador. El intervalo de ensayo usando Roundup Ultra™ puede incluir, pero sin limitación, de 0,56 a 17,93 kg/ha (8 oz/acre a 256 ozs/acre). El intervalo comercialmente eficaz preferido puede ser de 1,12 a 4,48 kg/ha (16 oz/acre a 64 oz/acre) de Roundup Ultra™, dependiendo del cultivo y de la fase del desarrollo de la planta. Un cultivo puede pulverizarse al menos con una aplicación de una formulación de glifosato. Para ensayar en algodón, una aplicación de 2,24 kg/ha (32 oz/acre) en la fase de 3 hojas puede continuarse por aplicaciones adicionales en las últimas fases en el desarrollo. Para el trigo puede usarse una aplicación de 2,24 kg/ha (32 oz/acre) de Roundup Ultra™ en la fase de 3-5 hojas y puede continuarse con una aplicación previa o posterior a la cosecha, dependiendo del tipo de trigo que vaya a ensayarse. Los parámetros de ensayo pueden optimizarse para cada cultivo con objeto de encontrar la planta particular que comprenda las construcciones de la presente invención que confiera el nivel de tolerancia a glifosato eficaz deseado desde el punto de vista comercial.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención.

Los ejemplos que no se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones se reservaron sólo para fines ilustrativos.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

Las construcciones de plásmidos usadas son construcciones de clonación de pUC o construcciones de transformación de plantas de doble límite que contiene un origen de replicación de *E. coli* tal como *ori322*, un origen de replicación de amplio intervalo de hospedador tal como *oriV* o *oriRi*, y una región codificante para un marcador de selección tal como *Spc/Str* que codifica el aminoglucósido adeniltransferasa (*aadA*) de Tn7 que confiere resistencia a espectinomicina o a estreptomycin, o un marcador de selección de gentamicina (*Gm*, *Gent*). Para la transformación en plantas, la cepa bacteriana hospedadora fue *Agrobacterium tumefaciens* ABI o LBA4404.

Los elementos genéticos se describen de la siguiente manera: P-e35S es el ARN 35S del VMCa que contiene una duplicación de la región -90-300 como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.424.200 ; P-FMV es el promotor del Virus del Mosaico de la Higuera, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.378.619; P-eFMV es un derivado del P-FMV;

CTP2 es la región del péptido de tránsito de la EPSP sintasa de *Arabidopsis*, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.633.435; *aroA:CP4syn* (*aroA:CP4*) es la región codificante de EPSP (secuencia sintética) de CP4, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.633.435 o además modificada para la expresión en

plantas en base al uso de codones de especies de plantas particulares; E9 3' es el extremo 3' de un aislado del gen RbcS del guisante que actúa como una señal de poliadenilación; nos es el extremo 3' del gen de nopalina sintasa que actúa como una señal de poliadenilación; Hsp70 es la secuencia líder no traducida de *Petunia hybrida* como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.362.865; GUS es la secuencia codificante de la beta-glucuronidasa de *E. coli* (Jefferson, R. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 83: 8447-8451, 1987); el borde derecho (BD) y el borde izquierdo (BI) son del plásmido Ti de las cepas de octopina y nopalina de *Agrobacterium tumefaciens*. El P-AtAct2 es el promotor del gen de actina 2 de *Arabidopsis thaliana*; AtAct2i es el intrón en la región 5' no traducida (UTR, acrónimo de *untranslated region*) del gen de actina 2 de *Arabidopsis thaliana*; P-AtAct8 es el promotor del gen de actina 8 de *Arabidopsis thaliana*; AtAct2i es el intrón en la UTR 5' del gen de actina 8 de *Arabidopsis thaliana*; P-AtAct11 es el promotor del gen actina 11 de *Arabidopsis thaliana*; AtAct11i es el intrón en la UTR 5' del gen de actina 11 de *Arabidopsis thaliana*; P-AtAct1a es el promotor del gen de actina1a de *Arabidopsis thaliana*, L-AtAct1a es la secuencia líder no traducida e I-AtAct1a es el intrón del ADN genómico del gen de actina 1a; P-AtAct1b es el promotor del gen de actina 1b de *Arabidopsis thaliana*, L-AtAct1b es la secuencia líder no traducida e I-AtAct 1b es el intrón del ADN genómico del gen de actina 1b; P-AtAct3 es el promotor del gen de actina 3 de *Arabidopsis thaliana*, L-AtAct3 es la secuencia líder no traducida e I-AtAct3 es el intrón del ADN genómico del gen de actina 3; P-AtAct7 es el promotor del gen de actina 7 de *Arabidopsis thaliana*, L-AtAct7 es la secuencia líder no traducida e I-AtAct7 es el intrón del ADN genómico del gen de actina 7; P-AtAct12 es el promotor del gen de actina 12 de *Arabidopsis thaliana*, L-AtAct12 es la secuencia líder no traducida e I-AtAct12 es el intrón del ADN genómico del gen de actina 12; P-AtEF1 $\alpha$  (P-AtEF1 o EF1 $\alpha$ ) es el promotor del gen del factor de elongación 1 $\alpha$  de *Arabidopsis thaliana*, AtEF1 $\alpha$ -i (AtEF1-i) es el intrón de la UTR 5' del gen del factor de elongación 1 $\alpha$  de *Arabidopsis thaliana*.

Las Figuras 1-18 proporcionan ejemplos de construcciones de transformación en plantas que contienen de uno a tres casetes de expresión de plantas. Los expertos en la técnica de la biología molecular vegetal pueden construir combinaciones múltiples de casetes de expresión en plantas que comprendan el promotor y los elementos genéticos de la presente invención y pueden realizar ensayos en plantas de cultivo sin demasiada experimentación. Las construcciones ilustradas en las figuras no deben considerarse como las únicas construcciones que pueden ensamblarse, si no que únicamente sirven como ejemplos para los expertos en la técnica. La Figura 1 (pCGN8086) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene un casete de expresión que comprende un promotor de la presente invención (P-AtAct8) unido operativamente a un gen de interés (CTP2-aroA:CP4syn). La Figura 2 (pMON45325) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene dos casetes de expresión que comprenden al menos un promotor de la presente invención (P-AtAct 11) unido operativamente a al menos un gen de interés (CTP2-aroA:CP4syn). La Figura 3 (pMON45331) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene un casete de expresión que comprende un promotor de la presente invención (P-AtEF 1 más intrón) unido operativamente a al menos un gen de interés (CTP2-aroA:CP4syn). La Figura 4 (pMON45332) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene dos casetes de expresión que comprenden al menos un promotor de la presente invención (P-AtEF más intrón) unido operativamente a al menos un gen de interés (CTP2-aroA:CP4syn). La Figura 5 (pMON9190) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene tres casetes de expresión en el que al menos dos promotores de la presente invención (P-AtEF1 más intrón, AtEF1 $\alpha$ -i; PAtAct2 más intrón, AtAct2i) están unidos operativamente a al menos un gen de interés (CTP2-aroA:CP4syn) y el promotor P-eFMV está unido operativamente a CTP2-aroA:CP4syn. Los casetes de expresión en plantas de la Figura 6 (pMON9153) son idénticos a los ilustrados en la Figura 4 (pMON45332), este mapa de plásmido se ilustra con el fin de identificar los casetes de expresión para los datos mostrados sobre los fenotipos de plantas en las tablas de datos mostradas en la memoria descriptiva. La Figura 7 (pCGN8099) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene dos casetes de expresión que comprenden promotores híbridos de la presente invención, P-FMV-AtEF1 $\alpha$  y P-e35S-AtAct8, que conducen la transcripción del gen de interés (aroA:CP4syn). La Figura 8 (pCGN8088) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene dos casetes de expresión que comprenden un promotor de la presente invención, P-AtAct8 más intrón, AtAct8i, y el promotor P-eFMV que conduce la expresión de un gen de interés (aroA:CP4syn). La Figura 9 (pCGN8068) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene dos casetes de expresión que comprenden un promotor de la presente invención, P-AtAct2 más intrón, AtAct2i, y el promotor PeFMV que conduce la expresión de un gen de interés (aroA:CP4syn). La Figura 10 (pCGN8096) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene dos casetes de expresión que comprenden promotores híbridos de la presente invención, P-FMV-AtAct11 y P-e35S-AtAct2, que conducen la transcripción del gen de interés (aroA:CP4syn). La Figura 11 (pCGN9151) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene dos casetes de expresión que comprenden promotores híbridos de la presente invención, P-FMV-AtEF1 $\alpha$  y P-e35S-AtAct2, que conducen la transcripción del gen de interés (aroA:CP4syn). La Figura 12 (pMON10156) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene un casete de expresión que comprende el promotor P-eFMV que conduce la expresión del gen de interés aroA:CP4syn, este vector se usa con fines comparativos con las secuencias promotoras de la presente invención. La Figura 13 (pMON52059) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene un casete de expresión que comprende un promotor híbrido (P-FMV-AtEF1 $\alpha$ ) que conduce la expresión del gen de interés (aroA:CP4syn). La Figura 14 (pMON54952) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene un casete de expresión que comprende un promotor de la presente invención (P-AtAct1a más intrón AtAct1a) unido operativamente a al menos un gen de interés (CTP2-aroA:CP4syn). La Figura 15 (pMON54953) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en

plantas que contiene un casete de expresión que comprende un promotor de la presente invención (P-AtAct1b más intrón AtAct1b) unido operativamente a al menos un gen de interés (CTP2-aroA:CP4syn). La Figura 16 (pMON54954) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene un casete de expresión que comprende un promotor de la presente invención (P-AtAct3 más intrón AtAct3) unido operativamente a al menos un gen de interés (CTP2-aroA:CP4syn). La Figura 17 (pMON54955) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene un casete de expresión que comprende un promotor de la presente invención (P-AtAct7 más intrón AtAct7) unido operativamente a al menos un gen de interés (CTP2-aroA:CP4syn). La Figura 18 (pMON54956) proporciona un ejemplo de una construcción de transformación en plantas que contiene un casete de expresión que comprende un promotor de la presente invención (P-AtAct12 más intrón AtAct12) unido operativamente a al menos un gen de interés (CTP2-aroA:CP4syn).

### Ejemplo 2

Las construcciones de clonación y las construcciones GUS se enumeran en la Tabla 1. El promotor y el intrón de actina 2 de *Arabidopsis* (número de entrada a Genbank U41998 como se describe en An et al., Plant J. 10: 107-121, 1996) se aislaron usando, como molde, ADN de *Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta* (Rogers and Bendich, Plant Mol. Biol. 5: 69, 1998) usando la SEC ID N° 1 (cebador directo) y la SEC ID N° 2 (cebador inverso) en una reacción de la siguiente manera: 0,5 µg de ADN molde, 25 pmol de cada cebador, taq polimerasa (BMB, Indianapolis, IN) usando perlas de cera para PCR “de inicio en caliente” (*hot start*). Las condiciones del termociclador de la PCR fueron las siguientes: 94 °C durante un minuto; 30 ciclos de: 92 °C durante 40 segundos, 55 °C durante un minuto, 72 °C durante un minuto y 30 segundos; y una prolongación de cinco minutos a 72 °C. La reacción PCR se purificó usando GeneClean II (Bio101 Inc., Vista, CA), la digestión se realizó con HindIII y NcoI y se ligó en la construcción pMON26149 (Tabla 1) se realizó la digestión con HindIII y NcoI. Se verificó la secuencia del clon promotor y la construcción resultante se denominó pMON26170 (Tabla 1).

**Tabla 1. Construcciones de clonación y construcciones GUS que contienen las secuencias promotoras de Actina y de EF1 de *Arabidopsis***

Construcción	Descripción	Promotor*/Gen/3'
pMON26149	construcción de clonación	
pMON26170	construcción de expresión en plantas	Act2/GUS/nos
pMON26171	construcción de expresión en plantas	Act8/GUS/nos
pMON8677	construcción de clonación	
pMON48407	construcción de expresión en plantas	Act11/GUS/nos
pMON26152	construcción de clonación	
pMON26177	construcción de expresión en plantas	EF1/GUS/nos
pMON11750	construcción de expresión en plantas	e35S/GUS/nos
pMON15737	construcción de expresión en plantas	VMH/GUS/nos

\* las secuencias promotoras de actina y del factor de elongación también contienen la secuencia intrón de la UTR 5' del gen correspondiente.

### Ejemplo 3

El promotor y el intrón de actina 8 de *Arabidopsis* (número de entrada Genbank U42007 como se describe en An y col., Plant. J. 10:107-121, 1996) se aislaron usando, como molde, ADN de *Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta* en condiciones PCR y procedimientos de purificación descritos en el Ejemplo 2 usando los cebadores de la SEC ID N°: 3 (cebador directo) y SEC ID N°: 4 (cebador inverso). El promotor se clonó usando las enzimas de restricción descritas en el Ejemplo 2, se verificaron las secuencias, y la construcción resultante se denominó pMON26171 (Tabla 1).

### Ejemplo 4

El promotor e el intrón de actina 11 de *Arabidopsis* (número de entrada Genbank U27981 como se describe en Huang y col., Plant Mol Biol., 33:125-139, 1997) se aislaron usando, como molde, ADN de *Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta* a condiciones PCR y procedimientos de purificación descritos en el Ejemplo 2 usando los cebadores de la SEC ID N°: 5 (cebador directo) y SEC ID N°: 6 (cebador inverso). El promotor se clonó usando enzimas de restricción EcoRV y NcoI y se ligaron en pMON8677 (Tabla 1), se verificaron las secuencias y la construcción resultante se denominó pMON48407 (Tabla 1).

### Ejemplo 5

El promotor y el intrón del factor de elongación 1α de *Arabidopsis* (AtEF1α) (número de entrada a Genbank X 16430 como se describe en Axelos y col., Mol. Gen. Genet. 219:106-112, 1989; Curie y col., NAR 19:1305-1310; Curie y col., Plant. Mol. Biol. 18:1083-1089, 1992; Curie y col., Mol. Gen. Genet. 238:428-436, 1993) se aislaron usando, como molde, ADN de *Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta* en condiciones PCR y procedimientos de purificación descritos en el Ejemplo 2 usando los cebadores de la SEC ID N°: 7 (cebador directo) y SEC ID N°: 8 (cebador

inverso). El promotor se clonó usando enzimas de restricción HindIII y NcoI y se ligó en pMON26152 (Tabla 1) como se describe en el Ejemplo 2, se verificaron las secuencias, y la construcción resultante se denominó pMON26177 (Tabla 1).

#### Ejemplo 6

5 Las construcciones de transformación en plantas descritas se acoplaron en *Agrobacterium*. La transformación del algodón se realizó esencialmente como se describe en el documento WO/0036911, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad. La transformación de *Arabidopsis* se realizó como se describe en Ye y col., Plant. Journal 19:249-257, 1999. La transformación del tomate se realizó como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.565.347 incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad.

#### 10 Ejemplo 7

Una construcción de ADN se transformó en un cultivo diana de interés mediante un sistema de administración apropiado tal como un procedimiento de transformación mediado por *Agrobacterium* (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.569.834 incorporada por referencia en el presente documento en su totalidad, Patente de Estados Unidos N° 5.416.011 incorporada por referencia en el presente documento en su totalidad, Patente de Estados Unidos N° 5.631.152 incorporada por referencia en el presente documento en su totalidad, Patente de Estados Unidos N° 5.159.135 incorporada por referencia en el presente documento en su totalidad, Patente de Estados Unidos N° 5.004.863 incorporada por referencia en el presente documento en su totalidad y la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/111795 incorporada por referencia en el presente documento en su totalidad). Como alternativa, puede usarse un procedimiento de bombardeo con partículas (véanse, por ejemplo, las Solicitudes de Patente WO 92/15675, WO 97/48814 y la Solicitud de Patente Europea 586,355 y las Patentes de Estados Unidos N° 5.120.657, 5.503.998, 5.830.728 y 5.015.580, todas ellas incorporadas por referencia en el presente documento en su totalidad).

Una gran cantidad de sistemas de transformación y regeneración y procedimientos se encuentra disponible y son bien conocidos por los expertos en la materia. Las plantas y la progenie, transformadas de manera estable, se analizan posteriormente para determinar la expresión de los genes en tejidos de interés mediante diversos procedimientos de evaluación molecular, inmunodiagnóstico, bioquímicos y/o de campo, conocidos por los expertos en la materia, que incluyen, pero sin limitación, un ensayo de pulverización con una formulación de glifosato a concentraciones eficaces desde el punto de vista comercial, realizado en una cámara de cultivo o en un entorno de campo.

#### 30 Ejemplo 8

Los ensayos GUS se realizaron por procedimientos rutinarios conocidos por los expertos en la materia (véase por ejemplo, Jefferson y col., EMBO J. 6:3901, 1987). Para el algodón, se sometieron a ensayo plantas R0. El tejido se seleccionó por tamaño en diversas fases del desarrollo, se tomaron muestras y se agruparon para los análisis. El brote floral del algodón se recogió y se extrajeron muestras de tejido reproductor masculino (anteras y filamentos), muestras de tejido reproductor femenino (todo el estigma, estilo y ovario) y corola (sépalos y pétalos). Para la selección por tamaño, se seleccionaron tres brotes florales de cada fase que incluyeron diversos tamaños incluyendo pequeño (menos de 0,5 cm), mediano (de 0,5-0,7 cm) y grande (fase vela o flor abierta). Las muestras foliares se recogieron aproximadamente después de 1-2 semanas de colocar las plantas de algodón en el invernadero y las otras muestras se recogieron aproximadamente de 1-2 meses más tarde. Las primeras flores no se recogieron (las cinco primeras posiciones de fructificación se dejaron intactas).

Para *Arabidopsis*, se analizaron plantas V1 y sólo se sometieron a ensayo segregantes homocigotos y heterocigotos. Se analizaron de ocho a diez sucesos por construcción (cinco plantas por suceso). Los resultados GUS para *Arabidopsis* representan muestras agrupadas de 8-10 sucesos. Los valores en las tablas descritas (Tabla 2 y Tabla 3) representan la expresión GUS promedio para el tejido indicado (pmol/MU/min/mg).

#### 45 Ejemplo 9

Las plantas se analizaron para la detectar la expresión GUS en tejido foliar y en tejidos reproductores incluyendo brotes florales inmaduros y flores. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Las construcciones sometidas a ensayo incluyeron pMON48407 (P-AtAct11 + intrón/GUS/nos), pMON26170 (P-AtAct2 + intrón/GUS/nos), pMON26171 (P-AtAct8 + intrón/GUS/nos), pMON11750 (e35S/GUS/nos), pMON26177 (P-EF1α + intrón/GUS/nos), y pMON15737 (P-FMV/GUS/nos). Los promotores de actina y del factor de elongación confirieron altos niveles de expresión GUS en tejidos múltiples incluyendo tejidos reproductores.

**Tabla 2. Expresión GUS promedio en V1 de *Arabidopsis***

Construcción	Hoja	Brote floral inmaduro	Flor	Gineceo	Androceo
pMON48407	6944	7394	8359	ND	ND
pMON26170	45238	74099	54502	73623	217292
pMON26171	29343	35884	37125	76311	207100
pMON11750	60844	14032	16263	35882	115049
pMON26177	47598	72871	96420	191066	507370
pMON15737	28314	57903	84457	44696	87876

**Ejemplo: 10**

Las plantas de algodón R0 se sometieron a ensayo para determinar la expresión del gen indicador de GUS en tejidos seleccionados de diversas fases de desarrollo. Los brotes florales se clasificaron por tamaño (pequeño, mediano y grande; grande = flor en vela y abierta). El androceo representa los tejidos reproductores masculinos. El gineceo representa los tejidos reproductores femeninos incluyendo todo el receptáculo (estigma, estilo y ovarios). La muestra de corola estaba compuesta de sépalos y pétalos. El tejido se preparó y los ensayos GUS se realizaron como se describe en el EJEMPLO 8. Los resultados se resumen en la Tabla 3. Las construcciones sometidas a ensayo incluyeron pMON48407 (P-EF1α + intrón/gus/nos), pMON26170 (P-AtAct2 + intrón/gus/nos) y pMON48407 (P-AtAct11 + intrón/gus/nos).

Se sometieron a ensayo seis plantas y se obtuvieron valores GUS promedio para pMON26177. Se sometieron a ensayo veinte plantas y se obtuvieron valores GUS promedio para pMON26170. Se sometieron a ensayo ocho plantas y se obtuvieron valores GUS promedio para pMON48407. Los resultados demuestran que los promotores de actina y del factor de elongación pueden usarse para la expresión eficaz de genes unidos operativamente, particularmente en tejidos reproductores.

**TABLA 3. Resultados de Ensayo GUS para Plantas de Algodón**

Construcción	Promotor/intrón	Tejido sometido a ensayo	Resultados GUS
pMON26177	EF1α	Hoja	11600
pMON26177	EF1α	Corola pequeña	396
pMON26177	EF1α	Gineceo pequeño	8670
pMON26177	EF1α	Androceo pequeño	13771
pMON26177	EF1α	Corola mediana	362
pMON26177	EF1α	Gineceo mediano	3318
pMON26177	EF1α	Androceo mediano	8006
pMON26177	EF1α	Corola grande	351
pMON26177	EF1α	Gineceo grande	500
pMON26177	EF1α	Androceo grande	15512
pMON26170	Act2	Hoja	12718
pMON26170	Act2	Corola pequeña	1296
pMON26170	Act2	Gineceo pequeño	16684
pMON26170	Act2	Androceo pequeño	7570
pMON26170	Act2	Corola mediana	742
pMON26170	Act2	Gineceo mediano	10041

(continuación)

Construcción	Promotor/intrón	Tejido sometido a ensayo	Resultados GUS
pMON26170	Act2	Androceo mediano	7893
pMON26170	Act2	Corola grande	289
pMON26170	Act2	Gineceo grande	3218
pMON26170	Act2	Androceo grande	42737
pMON48407	Act11	Hoja	28289
pMON48407	Act11	Corola pequeña	10
pMON48407	Act11	Gineceo pequeño	40755
pMON48407	Act11	Androceo pequeño	47834
pMON48407	Act11	Corola mediana	742
pMON48407	Act11	Gineceo mediano	52495
pMON48407	Act11	Androceo mediano	35573
pMON48407	Act11	Corola grande	1072
pMON48407	Act11	Gineceo grande	4869
pMON48407	Act11	Androceo grande	42737

**Ejemplo 11**

5 Las plantas transformadas también se sometieron a ensayo en un ensayo de pulverización en invernadero usando Roundup Ultra™, una formulación de glifosato, con un dispositivo pulverizador Track (Roundup Ultra es una marca registrada de Monsanto Company). Las plantas estaban en la fase de crecimiento de “dos” o más hojas verdaderas y las hojas se secaron antes de aplicar la pulverización de Roundup®. La formulación usada fue Roundup Ultra™ como una formulación de 3 libras/galones e.a. (equivalente de ácido). El calibre usado fue el siguiente:

Para un volumen de pulverización de 20 galones/acre:

10 Velocidad de la boquilla: 9501 flujo uniforme  
 Presión de pulverización: 40 psi  
 Altura de la pulverización: 18 pulgadas entre la parte superior del dosel y la punta de la boquilla  
 Velocidad de rastreo: 1,1 ft/sec., correspondiente a una lectura de 1950-1,0 voltios  
 Formulación: Roundup Ultra™ (3 libras e.a./galones)

15 Las concentraciones de pulverización variarán, dependiendo de los intervalos de ensayo deseados. Por ejemplo, para una tasa deseada de 8 oz/acre se usa una solución de trabajo de 3,1 ml/l y para una tasa deseada de 64 oz/acre se usa una solución de trabajo de 24,8 ml/l.

El período de evaluación variará dependiendo del cultivo, de la fase del desarrollo de la planta y del nivel de tolerancia deseado.

**Ejemplo 12**

20 Las construcciones de expresión en plantas usadas para la transformación del tomate se indican en la Tabla 4. Se exploraron plantas de tomate (T0) que contenían construcciones que comprendían al menos un promotor de actina o del factor de elongación (con intrón), unido operativamente a un gen de tolerancia a glifosato, *aroA:CP4* en un ensayo de pulverización con glifosato en un invernadero con una formulación de glifosato (Roundup Ultra™) para determinar la eficacia de conferir tolerancia a glifosato a plantas de tomate transgénicas. Opcionalmente, al menos  
 25 una secuencia promotora de actina o del factor de elongación unido operativamente a un gen *aroA:CP4* y un promotor de colimovirus eFMV unido operativamente a un *aroA:CP4* transformado en plantas de tomate se exploraron mediante aplicación por pulverización con glifosato (Roundup Ultra™). Las plantas de tomate se pulverizaron con 48 oz/acre, después se evaluaron a las dos semanas tras la aplicación para análisis de tolerancia vegetativa y hasta 60 días después de la aplicación para análisis de tolerancia reproductora. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y se clasifican de acuerdo con la eficacia de selección de líneas tolerantes reproductoras. El  
 30 porcentaje de tolerancia vegetativa es el porcentaje de las líneas exploradas que demuestran tolerancia vegetativa suficiente a lesión por glifosato para considerarse para estudios posteriores de rasgos agronómicos en la

preparación de candidaturas desde el punto de vista comercial. El porcentaje de tolerancia reproductora es el porcentaje de las líneas tolerantes vegetativas que también demuestran tolerancia reproductora suficiente para considerarse para una evaluación agronómica posterior. Todas las construcciones demostraron funcionalidad para proporcionar tolerancia vegetativa y reproductora a las plantas de tomate transgénicas. Diversas combinaciones de promotores son capaces de aumentar, la eficacia a la cual las líneas tolerantes vegetativas y reproductoras deben seleccionarse por exploración en este experimento. Las construcciones que contienen el promotor EF1α de *Arabidopsis* se asocian más específicamente con un elevado porcentaje de líneas tolerantes desde el punto de vista vegetativo. El promotor P-Act2 en combinación con P-eFMV y P-AtEF1α (pCGN9190), explorados por este procedimiento, proporcionaron un aumento en el porcentaje de líneas tolerantes desde el punto de vista reproductor.

**Tabla 4. Ensayos de Pulverización Track en Invernadero con una Tasa de Aplicación de 48 oz/Acre\***

Construcción	Descripción	Nº de líneas sometidas a ensayo	de tolerancia vegetativa <sup>1</sup>	de tolerancia reproductora <sup>2</sup>
pCGN9190	eFMV/CP4 + EF 1α/CP4 + Act2/CP4	930	83,2	52,4
pCGN9153	EF1α/CP4 + eFMV/CP4	391	73,9	38,9
pCGN8086	Act8/CP4	21	47,6	38,1
pCGN8099	EF1α/CP4 + Act8/CP4	71	84,5	36,6
pCGN8088	eFMV/CP4 + Act8/CP4	144	79,9	34,7
pMON45325	eFMV/CP4 + Act11/CP4	90	70,0	34,4
pCGN8096	Act11/CP4 + Act2/CP4	201	62,7	10,4
pCGN8067	Act2/CP4	205	67,3	8,8

\* una aplicación

<sup>1</sup> resultados agrupados de 25 exploraciones. Puntuado 14 días después de la aplicación

<sup>2</sup> resultados agrupados de 25 exploraciones. Puntuado hasta 60 días después de la aplicación

La producción de semillas de tomate se usa como una medición de la eficacia de las diversas secuencias promotoras y combinación de casetes de expresión en la presente invención para conferir tolerancia a glifosato a las plantas de tomate transgénicas. En la Tabla 5, se muestran los resultados de tres experimentos de campo en plantas de tomate transgénicas que contienen construcciones con los promotores de la presente invención que conducen la expresión de la secuencia codificante *aroA:CP4* para la tolerancia a glifosato. El experimento 1 es un ensayo de las plantas producidas a partir de las construcciones que contienen el promotor del virus del mosaico de la higuera (P-FMV) en la versión natural y derivada duplicada (P-eFMV) y elementos genéticos adicionales en las construcciones que también se encuentran en las construcciones usadas para someter a ensayo las secuencias promotoras de la presente invención. También se sometieron a ensayo otros elementos genéticos, tales como la fuente de la secuencia 5' no traducida y el péptido tránsito de cloroplastos. La construcción pMON20998 comprende el P-eFMV, unido a la UTR 5' Hsp70 de petunia, secuencia líder unida al péptido de tránsito de cloroplasto (CTP2), de EPESPS de *Arabidopsis*, unido a la región de terminación 3' E9. La construcción pMON20999 solo difiere de pMON20998 porque el promotor es P-FMV. La construcción pMON10156 solo difiere de pMON20998 porque el CTP es el péptido tránsito de cloroplasto de EPSPS de *Petunia* (CTP4). La construcción pMON45312 solo difiere de pMON20998 porque la secuencia líder es la secuencia líder natural del FMV.

Las plantas de tomate se transplantaron en el campo en surcos. Las plantas se trataron con pulverizador en el campo a una tasa de 48 oz/acre con el herbicida Roundup. La semilla de tomate se recogió del fruto y se pesó. Una línea de tomate no pulverizada sirvió como control con fines comparativos y la eficacia de cada construcción se expresó como un porcentaje del control. El resultado del experimento 1 (columna 1 de la Tabla 5) es que el promotor del FMV y el P-eFMV sólo proporciona del 5-11 % de la producción de semillas de un control sin pulverizar. El experimento 2 y 3 ensayan las construcciones de la presente invención a diferentes localizaciones (columnas 2 y 3 de la Tabla 5). El experimento 2 se realizó en la misma localización que el experimento 1, las construcciones pCGN8099 (Figura 7), pCGN9151 (Figura 11) y pCGN9190 (Figura 5) se realizaron bien proporcionando 25-46 % de la semilla con respecto a un control no pulverizado. En una localización diferente que tenía una estación de cultivo más fría, el experimento 3 demostró que pCGN8068 (Figura 9), pCGN8088 (Figura 8), pCGN8099, pCGN9151, pCGN9153 (Figura 6) y pMON45325 (Figura 2) eran capaces de conferir suficiente tolerancia a glifosato para los tomates hasta ajustar el 34- 77 % de semillas normales de ajuste con respecto a un control no tratado.

**Tabla 5. Experimentos de producción de semillas de tomate**

	Exp. 1 Peso en gramos de la semilla	de control	Exp. 2 Peso en gramos de la semilla	de control	Exp. 3 Peso en gramos de la semilla	de control
pMON20998	0,52	5,3				
pMON20999	0,84	8,6				
pMON10156	0,50	5,1				
pMON45312	1,07	11,0				
pCGN8068			0,48	8,4	7,06	77,8
pCGN8088			0,43	7,6	3,09	34,1
pCGN8096			0,40	7,0		
pCGN8099			1,85	32,5	6,93	76,4
pCGN9151			1,46	25,7	6,11	67,4
pCGN9153			0,68	12,0	4,03	44,4
pCGN9190			2,64	46,4		
pMON45325			0,31	5,4	3,37	37,2
pCGN8067						
Control	9,73	100,0	5,69	100,0	9,07	100,0

**Ejemplo 13**

Las SEC ID N°: 1-8 y las SEC ID N°: 13-21 son cebadores de PCR diseñados a partir de la información de secuencia disponible públicamente para genes de *Arabidopsis thaliana* Act1, Act2 (Genbank N° U41998), Act3, Act7, Act8 (Genbank N° ATU42007), Act11 (Genbank N° ATU27981), Act12 y Elf1 $\alpha$  (Genbank N° X 16430). Estas secuencias se usan para prolongar la secuencia de ácido nucleico usando técnicas de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase por ejemplo, Mullis y col, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263, 1986; Erlich, y col., Solicitud de Patente Europea; 50,424; Solicitud de Patente Europea 84,796, Solicitud de Patente Europea 258,017, Solicitud de Patente Europea 237,362; Mullis, Solicitud de Patente Europea 201,184; Mullis, y col, Patente de Estados Unidos N° 4.683.202; Erlich, Patente de Estados Unidos N° 4.582.788; y Saiki, y col, Patente de Estados Unidos N° 4.683.194). Los expertos en la técnica conocen diversos procedimientos de amplificación por PCR y se usan para identificar secuencias de ácido nucleico adyacentes a una secuencia conocida. Por ejemplo, se han descrito procedimientos de PCR inversa (IPCR), que se usan para amplificar secuencias de ADN desconocidas adyacente a una región núcleo de secuencias conocidas. Otros procedimientos también se encuentran disponibles tales como PCR de captura (Lagerstrom M., y col., PCR Methods Applic. 1:111, 1991) y PCR andante (Parker y col., Nucleic Acids Res 19:3055, 1991). Diversos fabricantes también han desarrollado kits basados en modificaciones de estos procedimientos con objeto de identificar secuencias de interés. Los adelantos técnicos que incluyen mejoras en el diseño de cebador y adaptador, mejoras en la enzima polimerasa y capacidades de termociclador han facilitado procedimientos más rápidos y eficaces para aislar secuencias de interés.

20

**Tabla 5a. Secuencias de cebadores para el aislamiento de secuencias promotoras de actina y EF1 $\alpha$  de *Arabidopsis***

At. Actina 2 directo:	GCCTCAGCCATGGTGAGTCTGCTGCAAACACACAAAAAGA GTTCAAT
At. Actina 2 inverso:	TTTTTTTTGATATCAAGCTTCAACTATTTTTATGTATGCATAAT TC
At. Actina 8 directo:	TTTTTTTTGATATCAAGCTTCCATTTTTCT TTTGCATAAT TC
At. Actina 8 inverso:	GCATCGGCCATGGTGAGTCTTCTGCAATCAAAAACATAAA GATCTGA
At. Actina 11 directo:	TTTTTTTTTAAGCTTGATATCACAACCAATGTCAAATGG
At. Actina 11 inverso:	CCATCTGCCATGGTCTATATCCTGTG
At. EF1 $\alpha$ directo:	TTTTTTTTTAAGCTTGATATCGGAAGTTTCTCTCTTG
At. EF1 $\alpha$ inverso:	CTTTTCCCATGGTAGATCTCTGGTCAACAA ATC
At. Actina 1a directo:	CCAAGCTTAAATGACATCAGATACACGC
At. Actina 1b inverso:	CATAAGCTTAGAGGTCCAAATTCA
At. Actina I directo:	CCATCAGCCATGGTCTTCTACCTTTATGCAAA
At. Actina 3 directo:	CCAAGCTTACCACACTCAGATGCATAAACAAACACA
At. Actina 3 inverso:	CATCAGCCATGGTCTACTCTCTGCAAAAACA
At. Actina 7 directo:	GCAAAGCTTACTAGTCAACAATTGGCC
At. Actina 7 inverso:	GATCGGCCATGGTTCATAAAAAAAG
At. Actina 12 inverso:	GGAAGCTTGCGGCCGCTTTCTACTCTACATGTTTCT

- 5 Se homogeneizaron hojas de plantas jóvenes de *Arabidopsis thaliana* (1 g) en 9 ml de tampón CTAB (Saghai Maroof y col. 1984, PNAS 81:8014-8018). El tampón CTAB contenía TrisHCl 100 mM, pH 7,8, NaCl 700 mM, EDTA 50 mM, CTAB (bromuro de alquiltrimetilamono) al 1 % y 2-mercaptoetanol 140 mM. Después de 90 minutos de incubación a 65 °C, se añadieron 4,5 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y las muestras se mezclaron durante 10 minutos. La capa acuosa se separó por centrifugación durante 10 minutos a 1500 g y se volvió a extraer con cloroformo: alcohol isoamílico. Después de una segunda centrifugación, la capa acuosa se transfirió a un tubo contenía 50 ml de ARNasa 10 mg/ml (sin DNasa) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos para retirar el ARN. El ADN se precipitó con 6 ml de isopropanol y se volvió a suspender en 1 ml de tampón TrisHCl 10 mM, pH 8,5. La solución de ADN se extrajo una vez con un volumen igual de fenol y una vez con un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico. Después de la centrifugación, se añadió un volumen de 1/10 de acetato de sodio (3 M, pH 5,2) a la capa acuosa, seguido por un volumen de 2,5 de etanol. El ADN se ensartó, se lavó en etanol al 70 % y después se secó al aire y se volvió a suspender en 0,2 ml de tampón TrisHCl 10 mM.
- 10
- 15 El ADN genómico de *Arabidopsis* (100 ng) se usó en reacciones PCR de 50 ml. Las reacciones contenían los cebadores mostrados en la Tabla 5a que contenían soluciones de cebador inverso y directo de 0,2 mM, los dNTP 200 nM y tampón de PCR con mezcla de magnesio y ADN polimerasa del sistema PCR Expand™ High Fidelity (Roche Molecular Biochemicals). Después de 2 minutos de desnaturalización iniciales a 94 °C las reacciones se ciclaron 35 veces durante 0,5 minutos a 94 °C, 0,5 minutos a 55 °C y 1,5 minutos a 72 °C. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Los fragmentos de ADN aislados en gel, que representaban secuencias de actina 1a, actina 1b, actina 7 y actina 12, se fosforilaron con ADN quinasa de T4 y se ligaron a una construcción de clonación pUC19 de corte Sma I y desfosforilada. Las colonias blancas se exploraron para detectar la presencia de insertos apropiados y se secuenciaron con M13 para confirmar la presencia de promotores de actina. Los clones seleccionados se denominaron pMON54941 (P-AtAct1a), pMON54942 (P-AtAct1b), pMON54943 (P-AtAct7) y pMON54944 (P-AtAct12). Posteriormente, los fragmentos de ADN promotores de actina se liberaron por digestión con Hind III y NcoI de las construcciones pUC19 que contenían las secuencias inserto, los fragmentos de ADN se aislaron en gel y se ligaron a pMON26165 que se había digerido con las mismas enzimas de restricción. Un producto PCR para el promotor de actina 3 (P-AtAct3) se digirió con Hind III y Nco I y se clonó directamente en pMON26165 para formar pMON54951. pMON26165 contenía el segmento del gen terminador GUS/nos. El ligamiento con los segmentos promotores permite ensayar cada promotor para detectar la actividad funcional por la expresión de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en células vegetales. Las células vegetales pueden aislarse, por ejemplo, protoplastos foliares de tabaco o las células vegetales pueden incluirse en un tejido u órgano vegetal, tal como, hoja, raíz, cotiledón, hipocotiledón, embrión, flor u órgano de almacenamiento.
- 20
- 25
- 30
- 35 El nivel de expresión de GUS conducido por esos promotores se sometió a ensayo en hipocotiledones de soja en comparación con GUS conducido por el promotor P-e35S (Tabla 6). Después se bombardeó con partículas de oro/ADN de plásmido a hipocotiledones de soja tras 48 horas se sometió a ensayo la actividad GUS histoquímicamente. Todos los promotores actina sometidos a ensayo en este análisis mostraron actividad funcional en el tejido hipocotiledón demostrando su utilidad para la expresión de transgenes en especies de plantas de cultivo heterólogas. Las construcciones que contenían EPSPS de *aroA:CP4* conducidas por los promotores de *Arabidopsis* actina 1a, (pMON54952), actina 1b (pMON54953), actina 3 (pMON54954), actina 7 (pMON54955) y actina 12 (pMON54956) de la presente invención se prepararon en construcciones de transformación de plantas binarias de *Agrobacterium* para determinar la expresión estable de I EPSPS resistente a glifosato en plantas de cultivo. Estas construcciones se transformaron en células de soja y de algodón, las células se seleccionaron y se regeneraron en plantas sobre glifosato que contenía medio de cultivo tisular y después se sometieron a ensayo para determinar la expresión de la proteína *aroA:CP4* y para determinar la tolerancia a la aplicación de glifosato. Las plantas que demostraron tolerancia a glifosato comercialmente aceptables se desarrollaron posteriormente por procedimientos de cultivo convencionales para transferir el rasgo de tolerancia a glifosato en el plasma germinal adaptado para el
- 40
- 45

cultivo.

**Tabla 6. Actividad de diferentes promotores de actina de *Arabidopsis* en un ensayo transitorio en comparación con P-e35S.**

Construcción	Actividad GUS
Pe35S/GUS	+++
P-AtAct1a/GUS	++
P-AtAct1b/GUS	++
P-AtAct3/GUS	++
P-AtAct7/GUS	++
P-AtAct12/GUS	+

#### 5 Ejemplo 14

La producción de algodón se correlaciona con el número de cuadrados establecidos durante las cuatro a cinco primeras semanas de la cuadratura. La conservación de estos cuadrados a bolas maduras y su contribución para la cosecha del hilo de algodón es un componente clave de la producción. Cuando se determina la eficacia de construcciones transgénicas para conferir tolerancia a herbicida en algodón, la cantidad de conservación de bolas es una medición de eficacia y es un rasgo deseable. Las plantas de algodón transgénicas que contienen promotores de la presente invención (Tabla 7) se sometieron a ensayo en condiciones de invernadero para la conservación de bolas. Los promotores dirigen la expresión de la secuencia codificante *aroA:CP4* para el fenotipo tolerante a glifosato. Las plantas se transformaron mediante un procedimiento mediado por *Agrobacterium* o mediante un procedimiento de bombardeo con partículas. Las construcciones de bombardeo de partículas contenían un GUS adicional que contenía un casete de expresión útil para localización histoquímica de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa a partir de los promotores de la presente invención. Las plantas transgénicas se degeneraron en medio que contenía glifosato y las plantas se enraizaron en un medio de enraizamiento. Las plántulas enraizadas se sembraron en el suelo y se transfirieron a una cámara de cultivo durante un período de endurecimiento. Las semillas de estas líneas de planta se recogieron y se plantaron. Quince plantas de cada línea se pulverizaron con glifosato a 3,36 kg/ha (48 onzas/acre) en la fase de 4 hojas. Al menos 8 plantas supervivientes de cada línea se pulverizaron de nuevo en la fase de 8 hojas con glifosato a 4 onzas/acre. Al llegar a la madurez, se contó el número de bolas de la primera posición para las cinco primeras bolas. Estas líneas que tenían 3 o más de las primeras posiciones de bolas conservadas después de la pulverización con glifosato (mapa de planta  $\geq 3$ ) se hicieron progresar para estudio posterior. La Tabla 7 ilustra los datos producidos a partir de este estudio. El número de líneas mapeadas indica el número de líneas que sobrevive a la primera aplicación con pulverización de glifosato. El patrón comercial es la línea 1445(pMON 17136) que contiene el promotor P-FMV que dirige la expresión del gen CTP2-*aroA:CP4/E9 3'*, esta línea conserva menos de 1 de las 5 primeras bolas. Las construcciones, pCGN8099, pCGN9153, pCGN8088, pCGN8068 proporcionan suficiente tolerancia a glifosato reproductora en el algodón de tal manera que el 14-35 % de las líneas sometidas a ensayo de estas construcciones se hicieron progresar para ensayos agronómicos posteriores.

**Tabla 7. Estudio de conservación de bolas de algodón en invernadero**

Construcción	Promotores	Nº de líneas	Mapeo de planta $\geq 3$ mapeo	% $\geq 3$
pCGN8099	FMV:EF1a + e35S:Act8	104	36	34,6 %
pCGN9153	EF1a + FMV	36	12	33,3 %
pCGN9165	EF1a + 35S/GUS	3	1	33,3 %
pCGN9152	EF1a	7	0	0,0 %
pCGN8088	Act8 + FMV	43	6	14,0 %
pCGN8086	Act8	7	0	0,0 %
pCGN8068	Act2 + FMV	37	7	18,9 %

(continuación)

Construcción	Promotores	Nº de líneas	Mapeo de planta $\geq 3$ mapeo	% $\geq 3$
pCGN8067	Act2	37	0	0,0 %
pCGN8084	Act2 + FMV + 35S/GUS	5	0	0,0 %
pCGN8085	Act2 + FMV/GUS	1	0	0,0 %
pCGN9164	Act11 + 35S/GUS	21	1	4,8 %
pMON45325	Act11 + FMV	43	0	0,0 %
pCGN8096	FMV:Act11 + e35S:Act2	14	0	0,0 %
pCGN9154	FMV:Act11 + e35S:Act2	16	1	6,3 %
Línea 1445	FMV		<1,0	

**Ejemplo 15**

5 La producción de algodón se correlaciona con el número de cuadrados establecidos durante las primeras cuatro a  
 cinco semanas de la cuadratura. La conservación de estos cuadrados a bolas maduras y su contribución para la  
 cosecha de hilo de algodón es un componente de producción clave. Cuando se determina la eficacia de  
 construcciones transgénicas para conferir tolerancia herbicida en algodón, la cantidad de conservación de bolas es  
 una medida de eficacia y es un rasgo deseable. Las plantas de algodón transgénicas que contienen promotores de  
 10 la presente invención se sometieron a ensayo en condiciones de campo en dos localizaciones para la conservación  
 de bolas. Las líneas de algodón transgénicas 502-254-2 (pCGN8068), 701-178-2 (pCGN8068), 53-2 (pCGN8088),  
 178-1 (pCGN9153) y 60-1 (pCGN9153) se compararon con 1445 (línea de tolerancia a glifosato) y se incluyó  
 PM1218BR (parental Paymaster 1218) que contenía la construcción pMON17136 (P-FMV/CTP2-aroA:CP4/E93'),  
 una línea no transgénica de tipo silvestre, Coker 130. El diseño de campo es un diseño en bloque completo al azar  
 que consiste en 2 hileras x 20-30 pies x 3 repeticiones. El glifosato se aplica como una formulación de Roundup  
 15 Ultra™ a tasas de producto de 1,12 lb ai/A = 48 oz y producto 1,5 lb ai/A = 64 oz en la fase de 8 hojas del desarrollo  
 de la planta de algodón. Todas las parcelas de algodón se trataron de manera agresiva para el control de maleza y  
 control de insectos, así como otras entradas agronómicas tales como tiempo de siembra, fertilización, irrigación, uso  
 PGR y desfoliación. La conservación de bola en porcentaje se determinó mapeando la localización de cada una de  
 20 las bolas conservadas por selección al azar de diez plantas desde el centro de las dos hileras centrales (cinco de  
 cada hilera) de cada parcela a mapear. El primer mapeo debe realizarse 4 semanas antes de la primera flor (mapa  
 de media estación), un segundo mapeo debe realizarse en la cosecha. Los datos recogidos incluyen el número  
 25 bollas de la primera posición sobre los cinco nodos de floración inferiores que se cuentan como una indicación de la  
 tolerancia reproductora de las líneas de algodón transgénicas a glifosato. La Tabla 8 ilustra la ventaja de que los  
 promotores de la presente invención han conferido a las plantas de algodón transgénicas para la conservación de  
 bolas. Esta tolerancia reproductora potenciada tiene como resultado una producción de hilo aumentada (Tabla 9) y  
 también una producción de semilla aumentada (Tabla 10).

**Tabla 8. Conservación de bola en un mapa de planta de estación media de bolas inferiores de las 5 primeras posiciones**

	Localización 1			Localización 2		
	Sin tratar	48 oz/A	64 oz/A	Sin tratar	48 oz/A	64 oz/A
(17136)1445	68	67	53	81	63	62
(8068) 502-254-2	87	72	64	77	80	69
(8068) 701-178-2	85	77	60	84	86	76
(8088)53-2	89	81	80	79	76	73
(9153) 178-1	77	83	73	85	71	79
(9153) 60-1	80	89	81	77	82	87
PM1218BR	92	56	63			

**Tabla 9. Producción de hilo (libras/acre) y porcentaje de producción (Localización 1)**

Variedad de cultivo	Sin tratar	48oz/A	48oz/A %	64oz/A	64oz/A %
8068-502-254-2-4	1103	960	87,0 %	858	77,8 %
8068-701-178-2-2	1326	1219	91,9 %	1177	88,8 %
9153-60-1-1	1177	1206	102,5 %	1171	99,5 %
9153-178-1-1	1112	769	69,2 %	750	67,4 %
8088-53-2-11	1283	1071	83,5 %	1097	85,5 %
1445	1018	563	55,3 %	490	48,1 %
C130	1200	0	0,0 %	0	0,0 %
PM 1218 BR	1092	826	75,6 %	713	65,3 %

**Tabla 10. Producción de semillas de algodón (libras/acre) y producción en porcentaje (Localización 1)**

Variedad de cultivo	Sin tratar	48oz/A	48oz/A %	64oz/A	64oz/A %
8068-502-254-2-4	3357	2923	87,1 %	2646	78,8 %
8068-701-178-2-2	3720	3521	94,7 %	3328	89,5 %
9153-60-1-1	3294	3413	103,6 %	3316	100,7 %
9153-178-1-1	3468	2355	67,9 %	2218	64,0 %
8088-53-2-11	3404	2950	86,7 %	2968	87,2 %
1445	2835	1624	57,3 %	1372	48,4 %
C130	3272	0	0,0 %	0	0,0 %
PM 1218 B/RR	3036	2192	72,2 %	1885	62,1 %

**5 Ejemplo 16**

La eficacia del promotor híbrido P-FMV-AtEF1 $\alpha$  que conduce la expresión de la secuencia codificante CTP2-*aroA:CP4* (Figura 13, pMON52059) y P-FMV/CTP2-*aroA:CP4/E93'* (pMON15737) se comparó en *Arabidopsis thaliana* transgénica. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénica se produjeron por infiltración al vacío (Bechtold et al., C R Acad Paris Life Sci 316: 1194-1199) las semillas se sembraron en suelo en bandejas en una cámara de cultivo ajustada a 24°C, un ciclo de 16 horas de luz (120  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para permitir el crecimiento normal y el desarrollo de las plantas. Se seleccionaron plantas de *Arabidopsis* transgénicas tolerantes a glifosato suceso V1 pMON52059 por aplicación de pulverización del herbicida glifosato a una tasa de 1,68 kg/ha (24 onzas/acre), las plantas supervivientes se trasplantaron en macetas individuales. Ocho plantas pMON52059 V1 y ocho plantas homocigotas pMON15737 se pulverizaron una segunda vez correspondiente a la observación de la germinación antes de tiempo, aproximadamente 16 días después de una tasa de 1,68 kg/ha (24 onzas/acre). La segunda pulverización determinará la eficacia de las dos construcciones para conferir tolerancia reproductora. Las plantas se observaron para detectar efectos vegetativos de la aplicación de glifosato. Todas las plantas tuvieron tolerancia vegetativa completa y no se observaron flores anómalas. Sin embargo, el aborto de silicuas producido indicó que la semilla no se había establecido en las silicuas abortadas. La cantidad total de silicuas producidas por cada planta y las silicuas que contenían semillas (silicuas fértiles) se contaron y se clasificaron. Los resultados se muestran en la Tabla 9 e indican que la construcción promotora híbrida pMON52059 demostró una mejora mayor de 10 veces en silicuas fértiles, 89 % en comparación con pMON15737 al 8 %. La cantidad de estructuras fructíferas fértiles se relaciona con la cantidad de semillas que pueden producirse, esto es especialmente importante en cultivos cuyo rendimiento está asociado con el número de semillas. Los cultivos tales como algodón, soja, canola, trigo y maíz son cultivos en los que la tolerancia reproductora a glifosato es esencial para la Buena producción.

**Tabla 11. Comparación del promotor híbrido P- FMV-EF1 $\alpha$  (pMON52059) y P-FMV (pMON15737) en conferir tolerancia reproductora a glifosato en plantas de Arabidopsis.**

pMON52059				pMON15737			
Número de Planta	Silicuas Fértiles	Silicuas Totales	Porcentaje de Fertilidad	Número de Planta	Silicuas Fértiles	Silicuas Totales	Porcentaje de Fertilidad
8819	39	50	78,0 %	1	74	540	13,7 %
8820	626	691	90,6 %	2	23	600	3,8 %
8821	507	561	90,4 %	3	1	470	0,2 %
8822	0	69	0,0 %	4	20	646	3,1 %
8823	512	534	95,9 %	5	43	717	6,0 %
8827	326	354	92,1 %	6	22	651	3,4 %
8833	432	461	93,7 %	7	178	868	20,5 %
8838	323	374	86,4 %	8	40	520	7,7 %
<b>Total</b>	<b>2765</b>	<b>3094</b>	<b>89,4 %</b>	<b>Total</b>	<b>401</b>	<b>5012</b>	<b>8,0 %</b>

**Ejemplo 17**

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es un cultivo de importancia agronómica para el aceite y como alimento. Las construcciones pMON45325 (Figura 2), pMON45332 (Figura 4) y pMON45331 (Figura 3) de la presente invención se transformaron en girasol. La transformación mediada por *Agrobacterium* del girasol se ha indicado (Schrammeijer et al., Plant Cell Reports, 9: 55-60, 1990; EP 0 486 234). Los procedimientos conocidos por los expertos en la materia de la transformación de plantas con construcciones de expresión transgénica pueden incluir hipocotiledones, meristemos apicales, protoplasma y otros tejidos del girasol. Las líneas de girasol transgénicas SFB250-27 contienen el casete de expresión de pMON20999 (P-FMV/CTP2-aroA:CP4/E93'); SFB288-01, SFB295-09 contiene pMON45325 (P-FMV/CTP2-aroA:CP4/E93':P-AtAct11 + intrón/CTP2-aroA:CP4/E93'); SFB289-01 contiene pMON45332 (P-AtEF1 $\alpha$  + intrón/CTP2-aroA:CP4/E93':P-eFMV/CTP2-aroA:CP4/E93'); SFB303-08, SFB303-09, SFB303-11 y HA300B contiene pMON45331 (P-AtEF1 $\alpha$  + intrón/CTP2-aroA:CP4/E9). Estas líneas se sometieron a ensayo para determinar la tolerancia a glifosato y se muestra en la Tabla 12.

La tolerancia reproductora a glifosato en girasol puede medirse como una función del porcentaje de cabezas normales, porcentaje de tamaño de cabeza normal y producción de polen. Estas plantas se pulverizan con glifosato a en las etapas de hoja V-4 y V-8 a una tasa de 2,14 kg/ha (0,32 oz/acre) o 4,48 kg/ha (64 onzas/acre). Las plantas de girasol se evalúan para determinar la tolerancia vegetativa a glifosato. La tolerancia vegetativa se consigue a 2,24 y 4,48 kg/ha (32 y 64 onzas/acre) niveles de pulverización de glifosato tanto en las etapas V4 como V8 del desarrollo de la planta.

Las líneas de girasol transgénicas tolerantes a glifosato vegetativo se clasifican para el número de cabezas porcentaje de cabezas normal, porcentaje de tamaño de cabeza normal y porcentaje de liberación de polen normal. Estos rasgos se puntúan en un ensayo de campo en una localización. La tabulación de las puntuaciones de cabeza y producción de polen se muestran en la Tabla 12. Las líneas seleccionadas de las construcciones de la presente invención muestran un mayor porcentaje de cabezas normales, generalmente un porcentaje mayor de lo normal de tamaño de cabeza y una mejor liberación de polen.

**Tabla 12. Puntuaciones de resistencia a glifosato en girasol**

Nº de línea	Nº de cabezas	% de cabezas normal	% de tamaño de cabeza normal	% de liberación de polen
SFB250-27	28	29	75	36
SFB288-01	11	36	73	73
SFB295-09	28	57	64	68
SFB289-01	13	38	92	38
SFB303-08	25	68	92	64
SFB303-09	43	81	88	88
SFB305-11	45	71	84	100
HA300B	30	100	97	97
segregante no transgénico	0	0	0	0

**Ejemplo 18**

Los elementos reguladores de actuación en *cis* necesarios para una regulación del promotor correcta pueden identificarse mediante diversos medios. En un procedimiento, se realiza análisis de delección para eliminar regiones del promotor y los fragmentos de promotor resultantes se ensayan para detectar la actividad promotora. Los fragmentos de ADN se consideran necesarios para la regulación del promotor si la actividad del promotor truncado se modifica en comparación con el fragmento promotor original. Aunque este análisis de delección, puede identificar pequeñas regiones de ADN que serán necesarias para la regulación positiva o negativa de la transcripción. Los motivos de secuencia promotora también pueden identificarse y pueden modificarse por ingeniería genética nuevos promotores para contener estos elementos *cis* para modular la expresión de secuencias que pueden transcribirse unidas operativamente. Véase por ejemplo la Patente de Estados Unidos Nº 5.223.419 incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad, la Patente de Estados Unidos Nº 4.990.607 incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad y la Patente de Estados Unidos Nº 5.097.025 incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad.

Una estrategia alternativa es buscar secuencias similares entre promotores con similares perfiles de expresión. Los promotores con modelos de actividad solapantes pueden tener mecanismos reguladores comunes. Pueden usarse diversos programas informáticos para identificar, conservar e identificar motivos entre promotores incluyendo pero sin limitación MEME, SIGNAL SCAN o GENE SCAN. Estos motivos pueden representar sitios de unión para factores de la transcripción que actúan para regular los promotores. Una vez identificados los motivos de secuencia, su función puede someterse a ensayo. Por ejemplo, las secuencias motivo pueden deleccionarse del promotor para determinar si el motivo es necesario para una función de promotor correcta. Como alternativa, el motivo puede añadirse a un promotor mínimo para ensayar si es suficiente para activar la transcripción. Los elementos

5 reguladores negativos que se sospecha pueden someterse a ensayo para detectar la suficiencia añadiendo un promotor activo y ensayar para una reducción en la actividad del promotor. Algunos elementos reguladores de actuación en *cis* pueden requerir otros elementos para funcionar. Por lo tanto, pueden someterse a ensayo elementos múltiples en diversas combinaciones mediante cualquiera de los procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Una vez identificados los elementos promotores funcionales, los elementos promotores pueden modificarse a nivel de nucleótido para influir en la unión de la proteína. Las modificaciones pueden producir afinidades de unión más elevadas o más bajas que podrían influir en el nivel de la transcripción de este promotor.

10 Los elementos promotores pueden actuar de manera aditiva o sinérgica para influir en actividad promotora. En ese aspecto, los elementos promotores de diferentes regiones reguladoras 5' pueden colocarse en tándem para obtener un promotor con un espectro diferente de actividad o diferentes perfiles de expresión. Por consiguiente, combinaciones de elementos promotores de fuentes heterólogas o duplicación de elementos similares o el mismo elemento puede conferir un mayor nivel de expresión de secuencias que pueden transcribirse unidas operativamente, por ejemplo, un elemento promotor puede multimerizarse para aumentar los niveles de expresión específicamente en el modelo afectado por el elemento promotor. Los procedimientos técnicos necesarios para la construcción de construcciones de expresión que contienen los nuevos elementos reguladores 5' modificados genéticamente los conocen los expertos en la materia. Los promotores modificados por ingeniería genética se someten a ensayo en construcciones de expresión y se ensayan transitoriamente mediante unión operativa de los nuevos promotores con respecto a un gen indicador adecuado tal como GUS y se someten a ensayo en un ensayo de planta transitoria. Los nuevos promotores se unen operativamente a uno o más genes de interés y se incorporan en una construcción de transformación de plantas junto con uno o más elementos reguladores adicionales y se transforman en una planta diana de interés mediante un sistema de administración de ADN adecuado. Las plantas transformadas de manera estable y posterior progenie se evalúan mediante cualquier medio molecular de inmunodiagnóstico, bioquímico, fenotípico o de campo adecuado para evaluar la característica ( características) deseada.

25

**Listado de secuencias**

- <110> Fincher, Karen L.  
Flasinski, Stanislaw  
Wilkinson, Jack Q.
- 5 <120> Nuevas Construcciones de Expresión en Plantas  
<130> 11898 . 0018 . 00PC00 MOBS018P
- <140> US 60/171,173  
<141> 16-12-1999
- <160> 30
- 10 <170> PatentIn version 3.0
- <210> 1  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 15 <220>
- <223> Oligonucleótido Sintético
- <400> 1  
tttttttga tatcaagctt caactatattt tatgtatgc 39
- <210> 2  
<211> 47  
<212> ADN  
<213> Artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido Sintético
- 20 <400> 2  
gcctcagcca tggtagtct gctgcaaaca cacaaaaaga gtcaat 47
- <210> 3  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 30 <210> 4  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial
- 35 <220>
- <223> Oligonucleótido Sintético
- <400> 4  
gcatcggcca tggtagtct tctgcaatca aaaacataaa gatctga 47
- <210> 5  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido Sintético
- 45 <400> 5  
tttttttta agcttgatata cacaacaaa tgcaaatgg 40
- <210> 6

<211> 26  
<212> ADN  
<213> Artificial  
  
<220>  
5 <223> Oligonucleótido Sintético  
  
<400> 6  
ccatctgccca tggctatat cctgtc 26  
  
<210> 7  
<211> 37  
10 <212> ADN  
<213> Artificial  
  
<220>  
  
<223> Oligonucleótido Sintético  
  
<400> 7  
15 tttttttta agcttgatat cggaagtttc tctcttg 37  
  
<210> 8  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Artificial  
20 <220>  
  
<223> Oligonucleótido Sintético  
  
<400> 8  
cttttcccat ggtagatctc tggcaacaa atc 33  
  
<210> 9  
25 <211> 1219  
<212> ADN  
<213> Arabidopsis thaliana  
  
<400> 9  
  
30

ES 2 386 771 T3

caactatfff tatgtatgca agagtcagca tatgtataat tgattcagaa tcgffffgac 60  
gagttcggat gtagtagtag ccattatffa atgtacatac taatcgtgaa tagtgatag 120  
atgaaacatt gtatcftatt gtataaatat ccataaacac atcatgaaag acactffctt 180  
tcacggctcg aattaattat gatacaattc taatagaaaa cgaattaaat tacgftgaa 240  
tgtatgaaat ctaattgaa aagccaacca cgacgacgac taacgftgcc tggattgact 300  
cggfttaagt taaccactaa aaaaacggag ctgtcatgta acacgaggat cgacgaggc 360  
acagtcatga agccatcaaa gcaaaaagaac taatccaagg gctgagatga ttaattagft 420  
taaaaattag ttaacacgag ggaaaaggct gtctgacagc caggftcacgt tatcfttacc 480  
tgtggtcgaa atgattcgtg tctgtcgaft ttaattatft tfttgaaagg ccgaaaataa 540  
agftgtaaga gataaacccg cctatataaa ttcataatft ttcctctccg cftftgaaftg 600  
tctcgtftgc ctcctcactt tcatcagccg tftftgaatct ccggcgactt gacagagaag 660  
aacaaggaag aagactaaga gagaaagtaa gagataatcc aggagattca ttcctccgftt 720  
tgaatcftcc tcaatctcat cftcftccgc tctftcfttc caaggtaata ggaactftct 780  
ggatctactt tattftgctgg atctcgatct tgtfttctca atftccttga gatctggaat 840  
tcgfttaatt tggatctgtg aacctccact aatcftfttg gftftactag aatcgatcta 900  
agftgaccga tcagfttagct cgattatagc taccagaatt tggcttgacc ftgatggaga 960  
gatccatgft catgftacct gggaaatgat ftgtatatgt gaattgaaat ctgaaactgft 1020  
gaagfttagat tgaatctgaa cactgtcaat gfttagattga atctgaacac tgtftaagft 1080  
agatgaagft tgtgtataga ttcftcgaaa cftftaggatt tgtagtgtcg tacgfttgaac 1140  
agaaagctat ttcftgattca atcagggftt atftgactgt attgaaactct tftftgtgtg 1200  
ftgcagcaga ctcacctg 1219

5 <210> 10  
<211> 1271  
<212> ADN  
<213> Arabidopsis thaliana

10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (535)..(536)  
<223> y = c ó t/u

15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (561)..(561)  
<223> y = c ó t/u

<400> 10

ES 2 386 771 T3

ccatTTTTct tttgcataat tcatgtttat ttttttattt ttttcatctt gcataattca 60  
 tgtttaaaag gatataatac tgggtctact acattctcct gacattacgt tttatgtggt 120  
 tgtcttctga aaataatcat caaaatattt caggacttgt ttacgttttc aggagaaaaa 180  
 aaataactgt acccttttca atatagaaat aacatttgta gaaatcgtgg attttcctta 240  
 ataaacaatc caaaacacga ccaccgttgt ctctcgcact cggtaacacc cgategccga 300  
 cttgaaaatt agaagaaaaa tgaaaagaat aataaaaaaa aaaaaggaat gatgattgaa 360  
 gctgtcatat atgtcgacc cttcacagtc aatccaatag cctatattcg ccaactgata 420  
 tatccaacgg ctcacaaatt ttcacaaact tttcaaaaaa gtataataaa agaggctgtc 480  
 tgacagccat gtcacgttat actttttccg tatgatcgaa atgattcgtc tttgyygaat 540  
 ttaattattt ccaaaattga ygactctaaa gaaaaaaaaa tagtttttca gataaacccg 600  
 cctatataaa tagttcaaca ctcggtttat ttctttctcc ctcaaagaat tgctcgtcg 660  
 tcttcagctt catcggccgt tgcatttccc ggcgataaga gagagaaaga ggagaaagag 720  
 tgagccagtt cttcatcgtc gtggttcttg tttcttctc gatctctcga tcttctgctt 780  
 ttgcttttcc gattaaggta attaaaacct ccgatctact tgttcttgtg ttggatctcg 840  
 attacgattt ctaagttacc ttcaaaagtt gtttccgatt tgattttgat tggaaattag 900  
 atcggcmeta ctattggaaa tttttgatcc tggcaccgat tagctcaacg attcatgttt 960  
 gacttgatct tgcgttgat ttgaaatcga tccggatcct ttcgcttctt ctgtcaatag 1020  
 gaatctgaaa tttgaaatgt tagttgaagt ttgacttcag attctggtga tttattgact 1080  
 gtaacatttt gtcttccgat gagtatggat tegtgtgaaat ctgctttcat tatgattcta 1140  
 ttgatagata catcatacat tgaattgaat ctactcatga atgaaaagcc tggtttgatt 1200  
 aagaaagtgt tttcggtttt ctcgatcaag attcagatct ttatgttttt gattgcagat 1260  
 cgtagaccat g 1271

<210> 11  
 <211> 1393  
 <212> ADN  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 <400> 11

5

ES 2 386 771 T3

acaaccaaat gtcaaatgga atgcatcaga gaccaaact gtaagagtcc acaaaaacaat 60  
 tcaaagaaag aatatcaaca attcagagat tcaatcctaa aacaaaaaga gaactgaaac 120  
 caaatcgtac ctacacgacc agtgaagata ccaatagaga gctctgttgt agaatacaac 180  
 acattaagcg caattagcag aaacagtctc ttcattctgcc gatttccact tgtcactact 240  
 ccaaaaact cccaaccat ttccaaaaca gacacttttg ccatgtctac atctttccct 300  
 tccccgaaa acacatcatt tccatcaacg gagtaaataat ccggcggcat atcgatgctc 360  
 gagaccgtcc tatcgagaaa aggcttagcc gcttccgtga ccgccggcgt tcgtggaccg 420  
 tgagattgct gaaacgagcg agaataagca agcctccgat cattagcagc atatccgaca 480  
 tcgctgctcc gatcatcagg gagctcgta tcgcctcgag gattaaagga aatggatctc 540  
 tccattttct tctttgatct taaagttcca acttcggcaa atactaaaat caacagtcag 600  
 tcgtacaaag aaactctgct tatacagtaa agtcaatggg ccaactgttct aagcccatat 660  
 ataattttag aagcccatag aatacaaaaag agtcaagaag cattgaccgc acaagaaaaa 720  
 aacaattggt aaaaagggtt ggtagtggtg tatgtatata tgaaatgcaa caaacattat 780  
 acagcccatt aaatatggtt gttataggta gatgtcccca ttaaggaact ttatccagcc 840  
 cattaatta ctttacagag taaaagagag agagaagatt tacagttacg ttaccaaat 900  
 ttcgaaatga ttttaattag taaaataaaa taattaaatg tcagttactc tctttagaaa 960  
 gctaaataag acagctgttt ccaccaacaa cgtgactggt cgtgggggtcc tccttcgttc 1020  
 aaagtgatat tcagaaatca acggctgaga tcttctccat caatatttat tacgggccta 1080  
 tccttcctt ttttaaactt caattctccg gctcacatc tcttcttcat tcgctccgtt 1140  
 tctctctcaa aaactacaca cccgtaccac accaccacc tctcgtttc ctgagagatc 1200  
 ccctctctaa cttctaaggt aatcacattt ccataacggt ccatcgtcat tgattcttca 1260  
 ttagtatgcy tttatgaagc tttttcaatt taattctctt tggtagatct taagattcct 1320  
 ctgtttcttg caaaataaag ggttcaatta tgctaataat ttttatatca attttgacag 1380  
 gatatagacc atg 1393

<210> 12  
 <211> 1160  
 5 <212> ADN  
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (565) .. (565)  
 <223> y = c ó t/u

ES 2 386 771 T3

<220>

<221> misc\_feature

<222> (571)..(571)

<223> y = c ó t/u

5

<220>

<221> misc\_feature

<222> (638)..(638)

<223> n = a ó g ó c ó t/u

10

<220>

<221> misc\_feature

<222> (656)..(656)

<223> n = a ó g ó c ó t/u

15

<400> 12

```

ggaagtttct ctcttgaggg aggttgctcg tggaatggga cacatatggt tgttataata      60
aaccatttcc attgtcatga gattttgagg ttaatataata ctttacttgt tcattatttt      120
at ttgggtggt tgaataaatg atataaatgg ctcttgataa tctgcattca ttgagatatac      180
aaatatttac tctagagaag agtgtcatat agattgatgg tccacaatca atgaaatttt      240
tgggagacga acatgtataa ccatttgctt gaataacctt aattaaaagg tgtgattaaa      300
tgatgtttgt aacatgtagt actaaacatt cataaaacac aaccaacca agaggtattg      360
agtattcacg gctaaacagg ggcataatgg taatttaaag aatgatatta ttttatgtta      420
aacctaaca ttggtttcgg attcaacgct ataaataaaa cactctcgt tgctgattcc      480
at ttatcggt cttattgacc ctagccgcta cacacttttc tgcgatatct ctgaggtaag      540
cgttaacgta cccttaratc gttcyttttc yttttcgtct gctgatcggt gctcatatta      600
tttcgatgat tgttggatc gatgctctt gttgattnat cgttctgaaa attcctnatct      660
gttgtttaga ttttatcgat tgttaatatc aacgtttcac tgcttctaaa cgataattta      720
ttcatgaaac tattttccca ttctgatcga tcttgttttg agattttaat ttgttcgatt      780
gattgttggg tgggtgatct atatacgagt gaacttggtg atttgcgtat ttaagatgta      840
tgtcgatttg aattgtgatt gggtaattct ggagtagcat acaaatcca gtgttcctt      900
tttctaaggg taattctcgg attgtttgc ttatatctct tgaattgcc gatttgattg      960
aatttagctc gcttagctca gatgatagag caccacaatt tttgtggtag aaatcggtt      1020
gactccgata gcggcttttt actatgattg ttttgtgtta aagatgattt tcataatggt      1080
tatatatgct tactgttttt attgattcaa tatttgattg ttcttttttt tgcagatttg      1140
ttgaccagag atctaccatg                                     1160

```

<210> 13

20

<211> 29

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido Sintético  
  
 <400> 13  
 cccaagctta aatgacatca gatacacgc 29  
  
 10 <210> 14  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido Sintético  
  
 <400> 14  
 cataagctta gaggtccaaa ttca 24  
 20  
 <210> 15  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Sintético  
  
 <400> 15  
 30 ccatcagcca tggcttctta cctttatgca aa 32  
  
 <210> 16  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
  
 <223> Oligonucleótido Sintético  
 40  
 <400> 16  
 ccaagcttac cacactcaga tgcataaaca aacaca 36  
  
 <210> 17  
 45 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 50 <223> Oligonucleótido Sintético  
  
 <400> 17  
 catcagccat ggtctactct ctgcaaaaac a 31  
 55 <210> 18  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 60 <220>  
  
 <223> Oligonucleótido Sintético  
  
 <400> 18  
 65 gcaaagctta ctagtcaaca attggcc 27

<210> 19  
<211> 28  
<212> ADN  
5 <213> Artificial  
  
<220>  
  
<223> Oligonucleótido Sintético  
10  
<400> 19  
gatcggccat ggctcactaa aaaaaaag 28  
  
<210> 20  
15 <211> 36  
<212> ADN  
<213> Artificial  
  
<220>  
20 <223> Oligonucleótido Sintético  
  
<400> 20  
25 ggaagcttgc ggccgcttc tactotacat gtttct 36  
  
<210> 21  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Oligonucleótido Sintético  
30  
<400> 21  
gactagccgc catggtcaa tctctagctg a 31  
  
<210> 22  
35 <211> 1578  
<212> ADN  
<213> Arabidopsis thaliana  
  
<400> 22

ES 2 386 771 T3

taaatgacat cagatacacg cttgtgaacc atctttaaag tattgatgga ctcttcacta 60  
 tgaaagctct ctttaaaatt aattttcttt gtacatgtct ctaagcaatg tcaaattaat 120  
 tagaggcca aattcaaaaa aatgtcgtat tgaatcattc cactactaaa ttgggtcaat 180  
 gtcagattta aacagcctag ggataattta gtgagatatg agattctact ttcaacatat 240  
 actaatccta aatctctage aactttttat ataagctata aatatcatga aaatgtattt 300  
 taategtttc ataatttatg cagtcacact aatggaaaaa aggccaatta ttattatttt 360  
 cttcagacta taaatgaaaa cataaattaa aatgcagatt agtttaaaat ttaataagt 420  
 aagtaaaatg cttatagcct tatacaaaaat catattttgga agtttctaac attggtgcaa 480  
 tttgttatca caaatcacag taatatttgt atactaatta gtaattacaa ctatacacia 540  
 atttaaattg gtaatcatat atttgtgtcc agtggattga acaaatatgc tcggcccatg 600  
 cggaagtaat gccaattttg ggtgagtaaa gcccatgcga aattttcaca taagaaatgc 660  
 atgctttttg ttttcaacga catgagttgc atgcttttta tcattgctta tatagttgca 720  
 agtttgcaac tccttgatat tttttttatg tagacactac taccacaaa aacttttggt 780  
 ctgcttattc ttgtttacta tgtaaaaaaa ataaatgaat tgtttattta ctccgatttg 840  
 atggagtctg gtttatgagg ttttatagcc ttacagaaa attgatagtt acaaaaatat 900  
 ttttcaaaaa taaaagggtg aaaccgtcat ttcaagttgt tattgttttg ggggactgga 960  
 tttgaaatga aatatagaac cggaaaacaa ggtgagccga agtcgaagcc tttggaccgg 1020  
 tttttatatt tactcctccc attcccttct cttcaatcc ttcttctctc ctctcctt 1080  
 cttcttcttc cctctttca ttttccagcc actacaaact tttctatctc tacttttttt 1140  
 cctctcgatt tcaggtactt tttgagacc tttgttgtga ttttgaaca cacacccea 1200  
 ttacgtttga tttttgatcc cgcacogatt tcaattcatc cgtttctgag tttcttttgg 1260  
 atctgggtgt cttgagctaa tcttttcgat ctgttgttta tcgattttac tcatgcgtat 1320  
 gttcattaca ccatttgta tttgtttaat caacaaaag actcatgttt ttcaaatgtc 1380  
 ttaataataa tttttctgat tgaattttat aatatttaca tgattctgga tccagaatat 1440  
 cttcttctt cttccatttt gtctgtatt gatttgtctt tgaaaaagga ttgttctttg 1500  
 tatctgtatt ggtgaaaaag gattgttatt tgttgataaa aattgatct ttaacaatg 1560  
 tttggttttg cataaagg 1578

<210> 23  
 <211> 1468  
 <212> ADN

ES 2 386 771 T3

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 23

ttagaggtcc aaattcaaaa aaatgtcgtg ttgaatcatt ccattactaa attggttcaa	60
tgtcagattt aaacagccta gggataattt agtgagatat gagattctac tttcaacata	120
tactaatcct aaatctctag caacttttta tataagctat aaatatcatg aaaatgtatt	180
ttaatcgttt cataatttat gcagtcacac taatggaaaa aaggccaatt attattattt	240
tcttcagact ataaatgaaa acataaatta aatgcagat tagtttaaaa ttttaataag	300
taagtaaaat gcttatagcc ttatacaaaa tcatatttgg aagtttctaa cattgttgca	360
atttgttatc acaaatcaca gtaatatttg tataactaatt agtaattaca actatacaca	420
aatttaaagtg ggtaatcata tatttgtgtc cagtggattg acaaatatg ctcggcccat	480
gcggaagtaa tgccaatttt gggtgagtaa agcccatgcg aaattttcac ataagaaatg	540
catgcttttt gttttcaacg acatgagttg catgcttttt atcattgctt atatagttgc	600
aagtttgcaa ctcttgata ttttttttat gtagacacta ctaccaccaa aaacttttgg	660
tctgcttatt cttgtttact atgtaaaaaa aataaatgaa ttgtttattt actccgattt	720
gatggagtct ggtttatgag gttttatagc ctttacagaa aattgatagt tacaanaata	780
tttttcaaaa ataaaagggt aaaaccgtca tttcaagttg ttattgtttt gggggactgg	840
atttgaaatg aaatatagaa ccggaaaaca aggtgagccg aagtcgaagc ctttggacc	900
gtttttatat ttactcctcc cattcccttc tcttcaate ctctctctct cctctcct	960
tcttctctct cccctcttcc attttccagc cactacaaac ttttctatct ctactttttt	1020
tctctctgat ttcaggtaact ttttgagacc ctttgttgtg attttcgaac acacacccca	1080
attacgtttg atttttgatc ccgcatcgat ttcaattcat ccgtttctga gtttcttttg	1140
gatctgggtg tcttgagcta atcttttoga tctgttgttt atcgatttta ctcatgctg	1200
tgttcattac accatttgtt atttgtttaa tcaacaaaaa gactcatggt tttcaaatgt	1260
ctttaatata atttttctga ttgaatttta taatatttac atgattctgg atccagaata	1320
tccttctctct tcttccattt tgtcctgtat tgatttgtct ttgaaaaagg attgttcttt	1380
gtatctgtat tggtgaaaaa ggattgttat ttgttgataa aaatttgatc tttaaacaat	1440
5 gtttggtttt gcataaagggt agaagacc	1468

<210> 24

<211> 1642

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

ES 2 386 771 T3

<400> 24

tcaagcttac cacactcaga tgcataaaca aacacagcaa gaagattgcc acaaaaatca 60  
 taacgaaata atcaagagat agctatcaaa tcgccaccgg cgaatcatgt catactcagt 120  
 atcagaaaca gatatgatag ctcaaaatat ggattaataa tgttactaaa cacatggaca 180  
 ataatgcatc aatattgaaa gaaagaaaat ggttttagcag aagcaaaatg gtttagaaag 240  
 taatgaaata cacattcaca aaggtgaaga attcgtcaag cctacaataa caaatgtcta 300  
 tactttatga gccacaaaag agatacatca cactatctga acgaaactaa agcaacctaa 360  
 catagtctag aaactactaa aatgaatggt tcaaaacaat tttaacagaa ggcaaaagtg 420  
 aaacaacata ctcttttgcg agaacgagga cgaggagcta attcacgtct ggtaacaaca 480  
 tgtcccttgt tcaacccaac gaacaaaccg gtcttcactt gtggagtgtg catcttctgt 540  
 aaatttcata gacaacaaac aaacaaaact ttctattcaa taaaaatca aattttacia 600  
 gagacggatt cagagataat aaagagatga agagagttaa atcaaaaggg attgatagaa 660  
 gataccta at caatggatcg agctcctccg gtggttcaga caaagaagg acgccgactg 720  
 aaaattacat ttttgtatat ataccagaga gactcaagaa aaaaccctag tccagtttgg 780  
 gcttttattg ggccttataa attttgggtc agttttgaca aagtaaatac aaggctatag 840  
 ctgctttgct aacgtgatta attatttacc atttaccaaa agccttaacc gaggccgagc 900  
 gagaaaaaaaa acaaaaaaaaa aggtagaggg caagaacgtc atttcacaaa ggaattgaat 960  
 cggaaaacga ggtgtgccga attcgaagcc tttggaccgg tttttatact tttttacttg 1020  
 ccattcgttt ttttttgttc attggcctca tttgattact tgtttctttg atttctcctt 1080  
 ccatagaacc gaattgtttt cagtctgaga tttctcctgc cgagagaacg attttaatct 1140  
 atttctcctg gtaatgttat agcctaattt gtgttttttt ctttttctcg atccggatat 1200  
 cgttattctg attgacaatt gtcagtttca tcttctatct tgtgaaattt tgattttttt 1260  
 ccgatctgtg atttcgtcat tgtatcagcg tgcttatatg cgtttgaggc gtaaatgagt 1320  
 gtgtacctca tttatcattt gctatgtttt tttttttaac agagatcttc agctgtaata 1380  
 ttataataga ttgaattgat aacgtgattc tggatctgga atatatatat gtcacattct 1440  
 tcttaggatt tgattttgtc tctctttgga tattaatatt cttcactccc ttgaaaatga 1500  
 atctgtttat tataatgttt agatatatct cttaccggca tttgttttag cataaatatg 1560  
 aaacatagca ttgactgatt tgtcttttta ttattcttgt ttttttgcca aattgggtctc 1620  
 atgtttttgc agagagtaga cc 1642

<210> 25

ES 2 386 771 T3

<211> 1241  
 <212> ADN  
 <213> Arabidopsis thaliana

5 <220>

<221> misc\_feature  
 <222> (26) .. (26)  
 <223> n = a ó g ó c ó t/u

10

<400> 25

```

actagtcaac aattggccaa tctttngttc taaattgcta ataaacgacc atttccgtca      60
attctccttg gttgcaacag tctacccgtc aaatgtttac taattataa gtgtgaagtt      120
tgaattatga aaaacgaaat cgtattaaaa attcacaaga ataaacaact ccatagattt      180
tcaaaaaaac agtcacgaga aaaaaaccac agaccgtttg tctgctcttc tagtttttat      240
tatttttcta ttaatagttt tttgttattt cgagaataaa atttgaacga tgtccgaacc      300
acaaaagccg agccgataaa tcctaagccg agcctaactt tagccgtaac catcagtcac      360
ggctcccggg ctaattcatt tgaaccgaat cataatcaac ggtttagatc aaactcaaaa      420
caatctaacg gcaacataga cgcgtcggtg agctaaaaag agtgtgaaag ccaggtcacc      480
atagcattgt ctctcccaga ttttttattt gggaaataat agaagaaata gaaaaaata      540
aaagagtgag aaaaatcgta gagctatata ttgcacatg tactcgtttc gctttcetta      600
gtgttagctg ctgccgctgt tgtttctcct ccatttctct atctttctct ctogctgctt      660
ctcgaatctt ctgtatcacc ttcttcttct tcaaggtgag tctctagatc cgttcgcttg      720
atthtgcctg tggtagtgc ttattggtga ttctctatgc cgatttcgct agatctgtht      780
agcatgcgth gtggthttat gagaaaatct ttgthttggg ggttgcttgt tatgtgatth      840
gatccgtgct tgttgatgc atctgagcta attcttaagg thtatgtgth agatctatgg      900
agthtgagga thcttctcgc thctgtcgat ctctcgctgt ththttgth ththtcagtg      960
aagtgaagth gthtagthcg aatgactth gtgtatgctc gattgatctg gththaatct     1020
tcgatctgth aggtgthgat gththacaagt gaattctagt gththctctt tgagatctgt     1080
gaagthtgaa ctagththtc tcaataatca acatatgaag cgatgththga gththcaataa     1140
acgctgctaa ththcgaaac taagthtgta thtgatthct gththactthca tgagctthtc     1200
caattcattt cggththcatt thactththth thtagtgaac c                               1241

```

15

<210> 26  
 <211> 1313  
 <212> ADN  
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 26

ES 2 386 771 T3

tttctactct acatgtttct tgttattagg taaagtatta ggctcttttt ttaaaaaaaaa 60  
 tgcttaatcc tctgggtacc tcgaaaaggg aataatactc tagttagata agtgcagcga 120  
 tcaacatgac aaaatgaatg aatgtttgct ttaattgggtg gctaaaagct aaatacacag 180  
 aaaagtcaaa attcaatctc aaaatcaacc cctctgtctc caatgtccct aatctatacc 240  
 aaaatgtcaa tttattttct tgatcatata ttccactaat taaaaataaa tccttcteta 300  
 atgaaatttg tcaaggcctt ggaagcctag ttttaaatat taaatggaaa ctatttcttc 360  
 aacaatcaca ctgttattta gtattggtgt atgttgttca ctactttctt catttgtttt 420  
 gtaagaaact ataataagca aaaacacata ataaagtctc atgtcaaata atgaatctta 480  
 tgcacatgct tgattatttt acttgccat atccctatca tcattatcac atttgtcaat 540  
 taccgttacc atcattactc tcattcttcc cagaactttt tcagcaattt ccatacctca 600  
 cccactaaga tcttttacc tttttcttaa ttatagtttg gatagcactc ttttacatag 660  
 cactgaaatt tcggttgaac acataaatta ctagaacta gaaggaaatg ttactgaaat 720  
 ttcactgatt gtctaaaatt gaataatcta aagaaaatgg ccttttaacc tttttcttag 780  
 gcccaaatgg gctcattacc actcatgctt gttcggtgac ccgattcttc cggtaaaaaca 840  
 gagcctaac cgtattttca ggtaggctg gtgttttctt aattctcaa ctaaaaaata 900  
 gatggacacg tgtctataga ggctgagata ttggctcaa tgaagaaaac taacggctca 960  
 gaccgtgta tgaacgatat taagggccaa agttgcttct gttttccaga aatttttgaa 1020  
 acccaatttc agggcacgat tccacaacct ctttcttttc ttctagatct acgtaaattc 1080  
 atcaggtaca tgttattttt tttgtttatt tgatgtcaaa attttgatca caaggaggca 1140  
 aaaccaatat aatgtaacg ctaatgcgtt tgattatggt atacgtaacg aattagattt 1200  
 aatggttaca ttttattggt ttagatttag ttatgagatt ggcattaatt attgggtgttt 1260  
 ctttgaatt tgctatgttt cttatggtga tgtaatcagc tagagattga acc 1313

<210> 27  
 <211> 1946  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>

10 <223> Sintético

<400> 27

ES 2 386 771 T3

aattctcagt ccaaagcctc aacaagggtca ggggtacagag tctccaaacc attagccaaa 60  
agctacagga gatcaatgaa gaatcttcaa tcaaagtaaa ctactgttcc agcacatgca 120  
tcatggtcag taagtttcag aaaaagacat ccaccgaaga cttaaagtta gtgggcatct 180  
ttgaaagtaa tcttgtcaac atcgagcagc tggcttgtgg ggaccagaca aaaaaggaat 240  
gggtgcagaat tgtaggcgc acctaccaa agcatctttg cctttattgc aaagataaag 300  
cagattcctc tagtacaagt ggggaacaaa ataacgtgga aaagagctgt cctgacagcc 360  
cactcactaa tgcgtatgac gaacgcagtg acgaccacaa aagaattagc ttgagctcag 420  
gatttagcag cattccagat tgggttcaat caacaaggta cgagccatat cactttattc 480  
aaattgggat cgccaaaacc aagaaggaac tcccatcctc aaaggtttgt aaggaagaat 540  
tcgatatccc cgcgcccgcg ttatcacaac caaatgtcaa atggaatgca tcagagacca 600  
aacctgtaag agtccacaaa acaattcaaa gaaagaatat caacaattca gagattcaat 660  
cctaaaacaa aaagagaact gaaaccaaat cgtacctaca cgaccagtga agataccaat 720  
agagagctct gttgtagaat acaacacatt aagcgcaatt agcagaaaca gtctcttcat 780  
ctgccgattt ccacttgta ctactccaaa aacctcccaa accatttcca aacagacac 840  
ttttgccatg tctacatctt tcccttcccc gaaaaacaca tcatttccat caacggagta 900  
aatatccggc ggcataatga tgctcgagac cgtcctatcg agaaaaggct tagccgcttc 960  
cgtgaccgcc ggcgttcgtg gaccgtgaga ttgctgaaac gagcgagaat aagcaagcct 1020  
ccgatcatta gcagcatatc cgacatcgct gctccgatca tcagggagct cgttatcgcc 1080  
tcgaggatta aaggaaatgg atctctccat tttcttcttt gatcttaaag ttccaacttc 1140  
ggcaaatact aaaatcaaca gtcagtcgta caaagaaact ctgcttatac agtaaagtca 1200  
atgggccact gttctaagcc catatataat tttagaagcc catagaatac aaaagagtca 1260  
agaagcattg accgcacaag aaaaaacaa ttgttaaaaa gggttgggta gtgtgtatgt 1320  
atatatgaaa tgcaacaaac attatacagc ccattaata tggttggtat aggtagatgt 1380

ES 2 386 771 T3

cccattaag gaactttatc cagcccatta aattacttta cagagtaaaa gagagagaga 1440  
 agatttacag ttacgttacc aaattttcga aatgatttaa ttagtaataa ataaataatt 1500  
 aatgtcagt tactctcttt agaaagctaa ataagacagc tgtttccacc aacaacgtga 1560  
 ctggtcgtgg ggtcctcctt cgttcaaagt gatattcaga aatcaacggc tgagatcttc 1620  
 tccatcaata tttattacgg gcctattcct tcctttttta aacttcaatt ctccggctca 1680  
 cattctcttc ttcattegct ccgtttctct ctcaaaaact acacaccgct accacaccac 1740  
 caccctcctc gtttcctcag agatcccctc tctaacttct aaggtaatca catttccata 1800  
 acgttccatc gtcattgatt cttcattagt atgcgtttat gaagcttttt caatttaatt 1860  
 ctctttggta gatcttaaga ttcctctggt tcttgcaaaa taaagggttc aattatgcta 1920  
 atatttttta tatcaatttt gacagg 1946  
 <210> 28  
 <211> 1695  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sintético  
 10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1198)..(1198)  
 <223> n = a o g o c o t/u  
 15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1216)..(1216)  
 <223> n = a ó g ó c ó t/u  
 20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1125)..(1125)  
 <223> y = c ó t/u  
 25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1131)..(1131)  
 <223> y = c ó t/u  
 30 <400> 28  
 aattctcagt ccaaagcctc aacaaggta gggtagacag tctccaaacc attagccaaa 60  
 agctacagga gatcaatgaa gaatcttcaa tcaaagtaaa ctactgttcc agcacatgca 120  
 tcatggtcag taagtttcag aaaaagacat ccaccgaaga cttaaagtta gtgggcatct 180  
 ttgaaagtaa tcttgtcaac atcgagcagc tggcttgtgg ggaccagaca aaaaaggaat 240

ES 2 386 771 T3

ggtgcagaat tgtaggcgc acctaccaa agcatcttg cctttattgc aaagataaag 300  
 cagattcctc tagtacaagt ggggaacaaa ataacgtgga aaagagctgt cctgacagcc 360  
 cactcactaa tgcgtatgac gaacgcagtg acgaccacaa aagaattagc ttgagctcag 420  
 gatttagcag cattccagat tgggttcaat caacaaggta cgagccatat cactttattc 480  
 aaattggtat cgccaaaacc aagaaggaac tcccatcctc aaaggtttgt aaggaagaat 540  
 tcgatatcaa gcttgatata ggaagtttct ctcttgaggg aggttgctcg tggaatggga 600  
 cacatatggt tggtataata aaccatttcc attgtcatga gattttgagg ttaatataata 660  
 ctttacttgt tcattatfff atttgggtgt tgaataaatg atataaatgg ctcttgataa 720  
 tctgcattca ttgagatata aatatattac tctagagaag agtgtcatat agattgatgg 780  
 tccacaatca atgaaatfff tgggagacga acatgtataa ccatttgctt gaataacctt 840  
 aattaaagg tgtgattaaa tgatgtttgt aacatgtagt actaaacatt cataaaacac 900  
 aaccaacca agaggtattg agtattcacg gctaaacagg ggcataatgg taatttaaag 960  
 aatgatatta ttttatgta aaccctaaca ttggtttcgg attcaacgct ataaataaaa 1020  
 ccactctcgt tgctgattcc atttatcgtt cttattgacc ctagccgcta cacacttttc 1080  
 tgcgatatac ctgaggtaa cgtaaacgta cccttarata gttcyttttc yttttcgtct 1140  
 gctgatcgtt gctcatatta tttcgatgat tgttggattc gatgctcttt gttgatnat 1200  
 cgttctgaaa attcctnatc gttgtttaga ttttatcgat tgttaataac aacgtttcac 1260  
 tgcttctaaa cgataattta ttcataaac tattttccca ttctgatcga tcttgttttg 1320  
 agattttaat ttgttcgatt gattgttggg tgggtgatct atatacgagt gaacttgttg 1380  
 attgctgat ttaagatgta tgcgatttg aattgtgatt gggtaattct ggagtagcat 1440  
 aacaaatcca gtgttcctt tttctaaggg taattctcgg attgtttgct ttatatctct 1500  
 tgaaattgcc gatttgattg aatttagctc gcttagctca gatgatagag caccacaatt 1560  
 tttgtggtag aatcggttt gactccgata gcggttttt actatgattg ttttgtgta 1620  
 aagatgattt tcataatggt tatatatgct tactgttttt attgattcaa tatttgattg 1680  
 ttcttttttt tgcag 1695

<210> 29  
 <211> 1800  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sintético

5  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
10

ES 2 386 771 T3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1068)..(1069)  
 <223> y = c ó t/u

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1094)..(1094)  
 <223> y = c ó t/u

10

<400> 29

```

ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg      60
cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaagggtggct cctacaaatg      120
ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtgggtcccaa      180
agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc      240
aaagcaagtg gattgatgtg atgggccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg      300
gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa      360
aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg      420
cctctgccga cagtggtecc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaaag      480
aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatcaag cttccatttt      540
tcttttgcac aattcatggt tattttttta tttttttcat cttgcataat tcatgtttta      600
aaggatatat acatgggtct actacattct cctgacatta cgttttatgt gtttgtcttc      660
tgaaaataat catcaaaaata tttcaggact tgtttacggt ttcaggagaa aaaaaataac      720
tgtacccttt tcaatataga aataacattt gtagaaatcg tggattttcc ttaataaaca      780
atccaaaaca cgaccaccgt tgtctcctcg actcggtaac acccgatcgc cgacttgaaa      840
attagaagaa aatgaaaag aataataaaa aaaaaaaagg aatgatgatt gaagctgtca      900
tatatgtcga ccctatcaca gtcaatccaa tagcctatat tcgccaactg atatatccaa      960
cggctcacia attttcacia acttttcaaa aaagtataat aaaagaggct gtctgacagc     1020
catgtcacgt tatacttttt ccgtatgatc gaaatgattc gtctttgyyg aatttaatta     1080
tttccaaaat tgaygactct aaagaaaaaa aatatgtttt tcagataaac ccgcctatat     1140
aaatagttca aactcgggtt tattttctct ccctcaaag aattgcctcg tcgtcttcag     1200
cttcatcggc cgttgcattt cccggcgata agagagagaa agaggagaaa gaggtagcca     1260
gatcttcate gtcgtggttc ttgtttcttc ctcgatctct cgatcttctg cttttgcttt     1320
    
```

ES 2 386 771 T3

tccgattaag gtaattaa cctccgatct acttgttctt gtggttgatc tcgattacga 1380  
 tttctaagtt accttcaaaa gttgtttccg atttgatttt gattggaatt tagatcggtc 1440  
 aaactattgg aaatTTTTga tcctggcacc gattagctca acgattcatg tttgacttga 1500  
 tcttgcggtg tatttgaat cgatccggat cctttcgctt cttctgtcaa taggaatctg 1560  
 aaatttgaaa tgtagttga agtttgactt cagattctgt tgatttattg actgtaacat 1620  
 tttgtcttcc gatgagtatg gattcgttga aatctgcttt cattatgatt ctattgatag 1680  
 atacatcata cattgaattg aatctactca tgaatgaaaa gcctggtttg attaagaaag 1740  
 tgttttcggt tttctcgatc aagattcaga tctttatggt tttgattgca gatcgtagac 1800

<210> 30  
 <211> 1742  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>

<223> Sintético

10

<400> 30

gtccgatgtg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60  
 ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aagggtggctc ctacaaatgc 120  
 catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tgggtcccaaa 180  
 gatggacccc caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca 240  
 aagcaagtgg attgatgtga tgggtccgatg tgagactttt caacaaaggg taatatccgg 300  
 aaacctcctc ggattccatt gccagctat ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa 360  
 ggaagggtggc tcctacaaat gccatcattg cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc 420  
 ctctgccgac agtgggtccca aagatggacc cccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga 480  
 agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt gatatcaagc ttcaactatt 540  
 tttatgtatg caagagtcag catatgtata attgattcag aatcgttttg acgagttcgg 600  
 atgtagtagt agccattatt taatgtacat actaatcgtg aatagtgata tgatgaaaca 660  
 ttgtatctta ttgtataaat atccataaac acatcatgaa agacactttc tttcacggtc 720  
 tgaattaatt atgatacaat tctaatagaa aacgaattaa attacgttga attgtatgaa 780  
 atctaattga acaagccaac cacgacgacg actaacgttg cctggattga ctcggtttaa 840  
 gttaaccact aaaaaaacgg agctgtcatg taacacgcgg atcgagcagg tcacagtcac 900

ES 2 386 771 T3

gaagccatca aagcaaaaga actaatccaa gggctgagat gattaattag tttaaaaatt	960
agttaacacg agggaaaagg ctgtctgaca gccaggtcac gttatcttta cctgtggtcg	1020
aatgattcg tgtctgtcga ttttaattat ttttttgaaa ggccgaaaat aaagttgtaa	1080
gagataaacc cgcctatata aattcatata ttttcctctc cgctttgaat tgtctcgttg	1140
tctcctcac tttcatcagc cgttttgaat ctccggcgac ttgacagaga agaacaagga	1200
agaagactaa gagagaaagt aagagataat ccaggagatt cattctccgt tttgaatctt	1260
cctcaatctc atctttctcc gctctttctt tccaaggtaa taggaacttt ctggatctac	1320
tttatttgct ggatctcgat cttgttttct caatttcctt gagatctgga attcgtttaa	1380
tttggatctg tgaacctcca ctaaactctt tggttttact agaatcgatc taagttgacc	1440
gatcagttag ctcgattata gctaccagaa tttggcttga ccttgatgga gagatccatg	1500
ttcatgttac ctgggaaatg atttgtatat gtgaattgaa atctgaactg ttgaagttag	1560
attgaatctg aacactgtca atgtttagatt gaatctgaac actgtttaag ttagatgaag	1620
tttgtgtata gattcttcga aacttttagga tttgtagtgt cgtacgttga acagaaagct	1680
attctgatt caatcagggt ttatttgact gtattgaact ctttttgtgt gtttgcagca	1740
ga	1742

## REIVINDICACIONES

1. Un promotor híbrido que comprende la secuencia como se expone en la SEC ID N° 28.
2. Una construcción de ADN que comprende: uno o más casetes de expresión que comprenden el promotor híbrido de la reivindicación 1 y una secuencia de ADN estructural unida operativamente al promotor híbrido.
- 5 3. La construcción de ADN de la reivindicación 2, en la que dicha secuencia de ADN estructural está además unida operativamente a una región 3' no traducida.
4. La construcción de ADN de la reivindicación 2 ó 3, en la que la secuencia de ADN estructural es un gen de tolerancia a herbicida.
5. La construcción de ADN de la reivindicación 4, en la que el gen de tolerancia a herbicida es un gen de tolerancia a glifosato.
- 10 6. La construcción de ADN de la reivindicación 5, en la que el gen de tolerancia a glifosato es un gen de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSP sintasa) o un gen de glifosato oxidorreductasa (GOX).
7. La construcción de ADN de la reivindicación 5, en la que el gen de tolerancia a glifosato es un gen *aroA:CP4*.
8. La construcción de ADN de la reivindicación 7, en la que el gen *aroA:CP4* está además unido operativamente a una secuencia de ADN estructural que codifica un péptido de transito de cloroplasto (CTP), en el que dicho CTP es el CTP2 de *Arabidopsis* (CTP2-*aroA:CP4*).
- 15 9. La construcción de ADN de la reivindicación 3, en la que la región 3' no traducida comprende un terminador de la transcripción.
10. La construcción de ADN de la reivindicación 8 ó 9, en la que el CTP2-*aroA:CP4* está además unido operativamente a la región de terminación 3' E9 (CTP2-*aroA:CP4*-E9 3').
11. La construcción de ADN de la reivindicación 2, en la que el uno o más casetes de expresión comprenden un promotor híbrido de la reivindicación 1 unido operativamente a una secuencia de ADN estructural que codifica una EPSPS de *aroA:CP4* como se muestra en la FIG. 11 ó 13, cuya secuencia ADN estructural está además unida operativamente a una secuencia de ADN estructural que codifica un CTP2 y una región de terminación 3' E9.
- 25 12. La construcción de ADN de la reivindicación 2 que comprende un primer y un segundo casete de expresión como se muestra en la Figura 7, en la que el primer casete de expresión comprende un promotor híbrido de la reivindicación 1 unido operativamente a una secuencia de ADN estructural que codifica una EPSPS de *aroA:CP4*, cuya secuencia de ADN estructural está además unida operativamente a una secuencia de ADN estructural que codifica un CTP2 y la región de terminación 3' E9, y el segundo casete de expresión comprende un promotor híbrido de CaMV:Act8 unido operativamente a una secuencia de ADN estructural que codifica una EPSPS de *aroA:CP4*, cuya secuencia de ADN estructural está además unida operativamente a una secuencia de ADN estructural que codifica un CTP2 y la región de la terminación 3' E9.
- 30 13. La construcción de ADN de la reivindicación 2, en la que la secuencia de ADN estructural es un gen de control de insectos de *Bacillus thuringiensis*.
- 35 14. Una célula de planta transgénica que comprende la construcción de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13.
15. Una planta transgénica que comprende la construcción de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13.
16. La planta transgénica de la reivindicación 15, caracterizada además por tener tolerancia vegetativa al glifosato y mostrar daño a glifosato bajo para el tejido reproductor.
- 40 17. La planta transgénica de la reivindicación 16, en la que la planta es capaz de tolerar la exposición a glifosato a una tasa de hasta 17,93 kg/ha (256 oz/acre).
18. La planta transgénica de la reivindicación 16, en la que la planta es capaz de tolerar la exposición a glifosato a una tasa que varía de 1,12 a 4,48 kg/ha (de 16 a 24 oz/acre).
- 45 19. La planta transgénica de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en la que dicha planta transgénica es una especie de cultivo monocotiledónea.
20. La planta transgénica de la reivindicación 19, en el que dicho cultivo monocotiledóneo es cebada, maíz, arroz, sorgo o trigo.
21. La planta transgénica de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en la que dicha planta es una especie

de cultivo dicotiledóneo.

22. La planta transgénica de la reivindicación 21, en el que dicho cultivo dicotiledóneo es alfalfa, tomate, soja, algodón, canola o girasol.

5 23. La planta transgénica de la reivindicación 22, en la que dicho cultivo dicotiledóneo es algodón que comprende la construcción de ADN como se muestra en la FIG. 7, teniendo dicho algodón un valor de mapa de bola mayor que o igual a 3 después de una exposición a glifosato después de la etapa de 4 hojas, en el que el valor de mapa de bola se determina pulverizando el algodón después de la etapa de 4 hojas con glifosato a una tasa de 3,36 kg/ha (48 oz/acre), permitiendo que la planta de algodón se desarrolle hasta la madurez y determinando la cantidad de bolas de primera posición para las cinco primeras bolas.

10 24. Una semilla de la planta transgénica de la reivindicación 15, en la que dicha semilla comprende dicha construcción de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13.

25. Una semilla de acuerdo con la reivindicación 24, en la que dicha semilla es una semilla transgénica seleccionada del grupo que consiste en semillas de *Arabidopsis thaliana*, soja, canola, trigo, maíz, algodón y tomate.

15 26. Un producto útil desde el punto de vista agronómico procesado a partir de la planta transgénica de la reivindicación 15, en el que el producto comprende la construcción de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13.

27. Uso del promotor híbrido de la reivindicación 1 en la construcción de una planta transgénica, en la que dicha planta transgénica comprende dicho promotor híbrido.

20 28. Un procedimiento para producir una planta transgénica, que comprende regenerar la célula de la planta transgénica de la reivindicación 14 en una planta transgénica, en la que dicha planta transgénica comprende dicha construcción de ADN.

29. Un procedimiento para expresar una secuencia de ADN estructural en una planta, comprendiendo el procedimiento:

25 (1) proporcionar una construcción de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13;  
(2) introducir la construcción de ADN en una célula vegetal; y  
(3) regenerar la célula vegetal para producir la planta de tal manera que la secuencia de ADN estructural pueda expresarse en la planta.

30. Un procedimiento para el control de malezas, comprendiendo el procedimiento:

30 (1) proporcionar una planta de cultivo transformada con una construcción de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12; y  
(2) aplicar a la planta de cultivo una cantidad suficiente de glifosato para controlar las malezas sin dañar a la planta de cultivo.

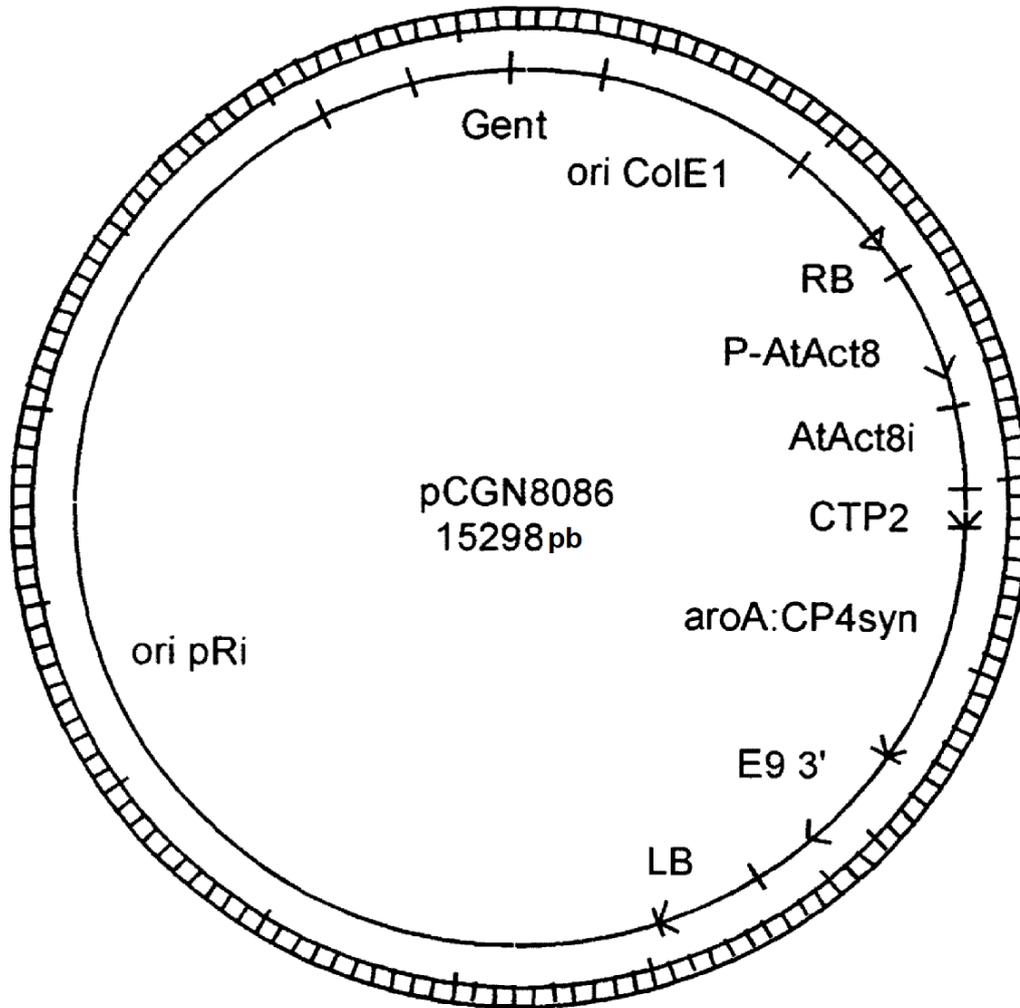


FIG. 1

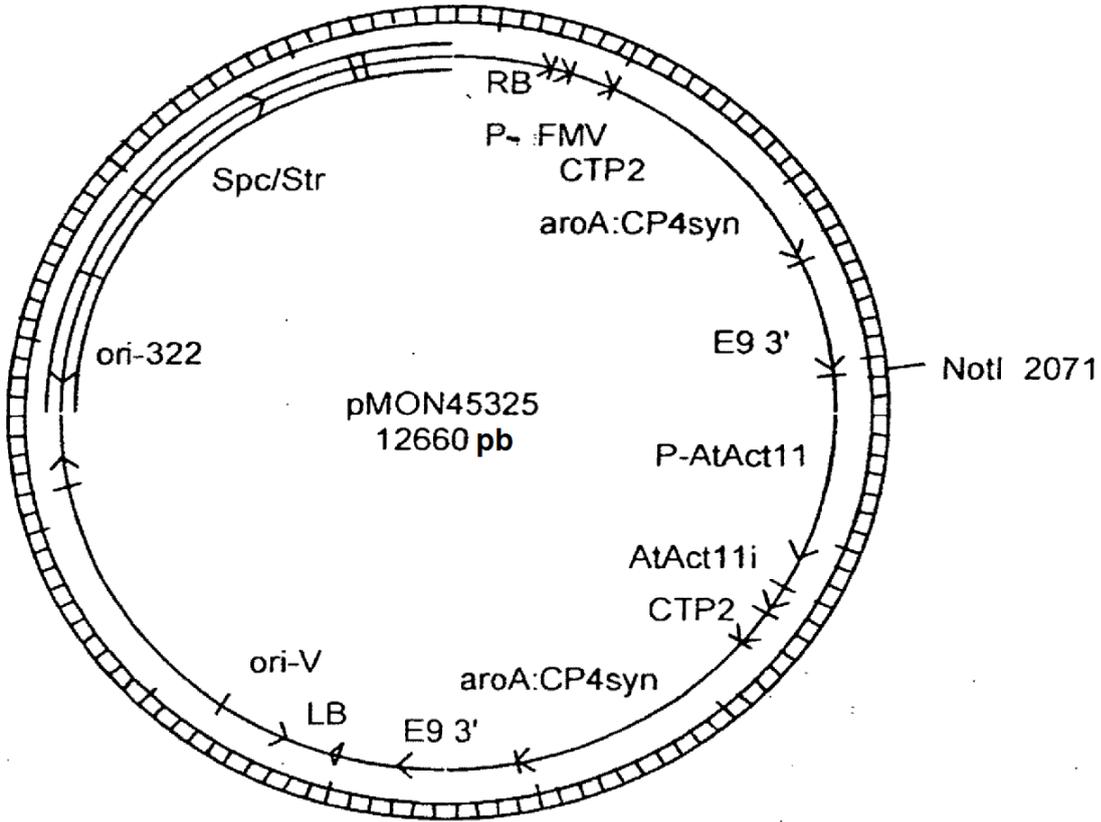


FIG. 2

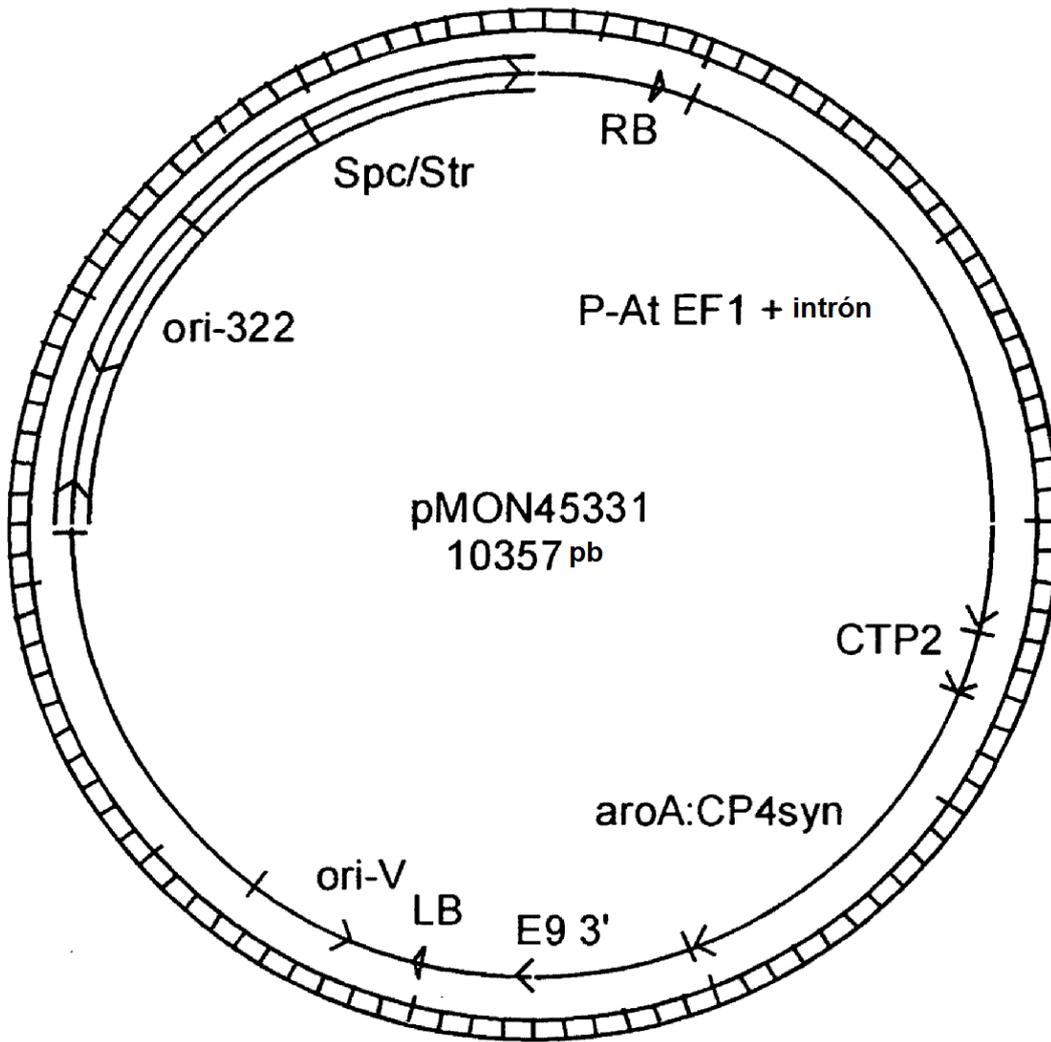


FIG. 3

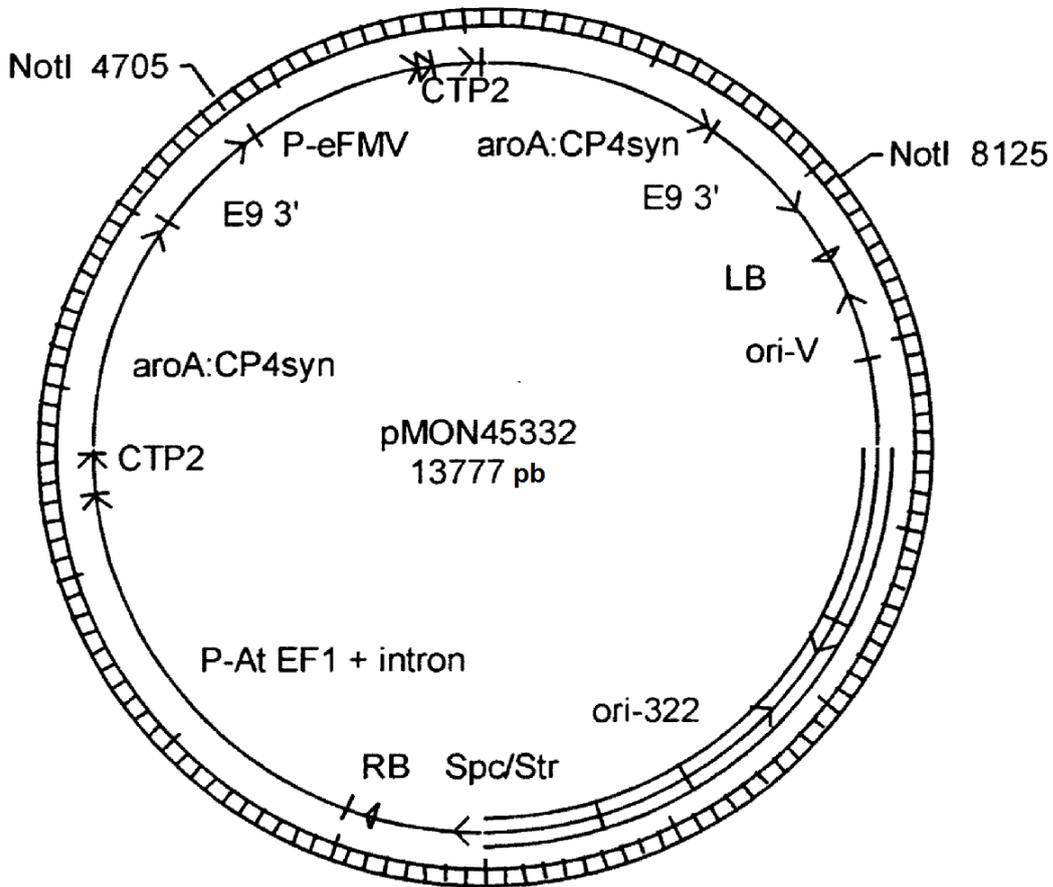


FIG. 4

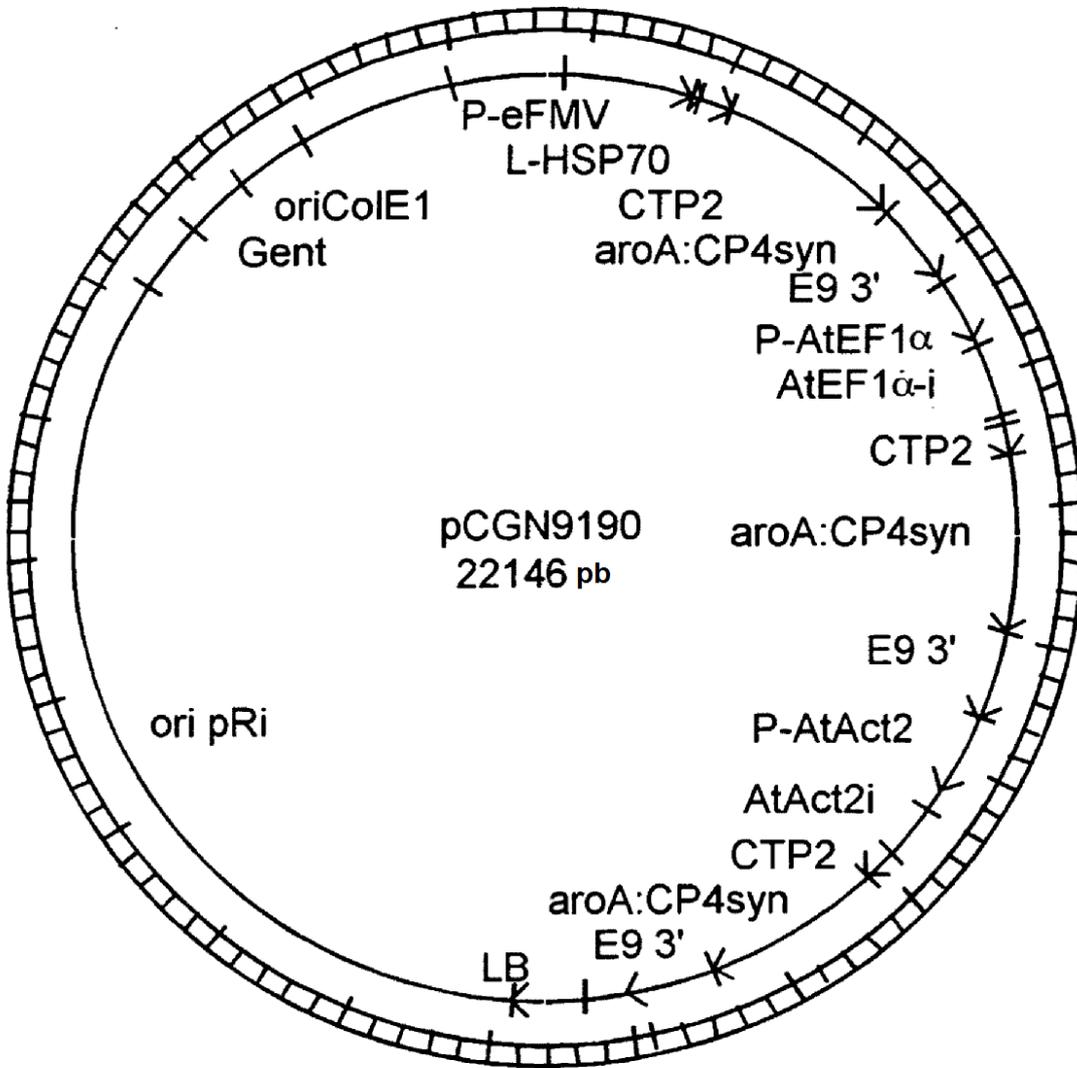


FIG. 5

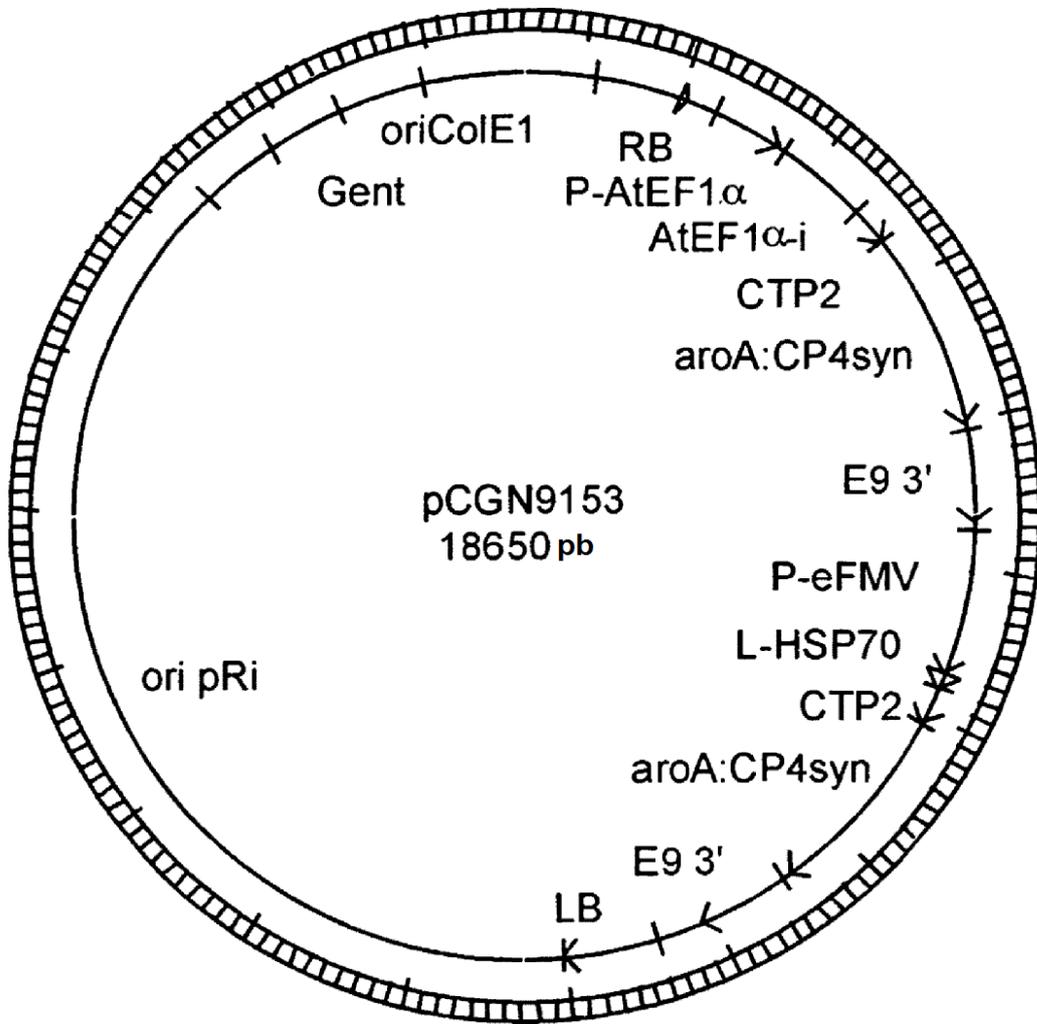


FIG. 6

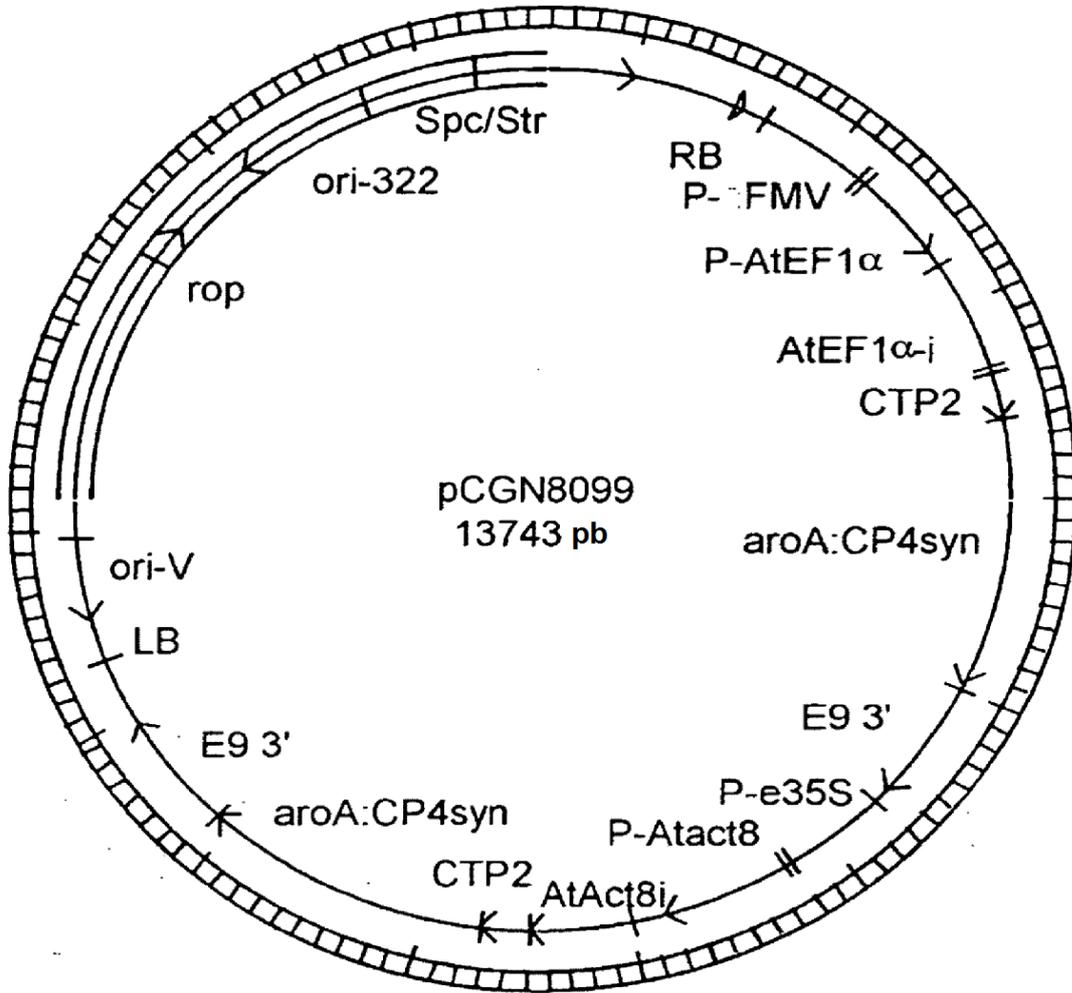


FIG. 7

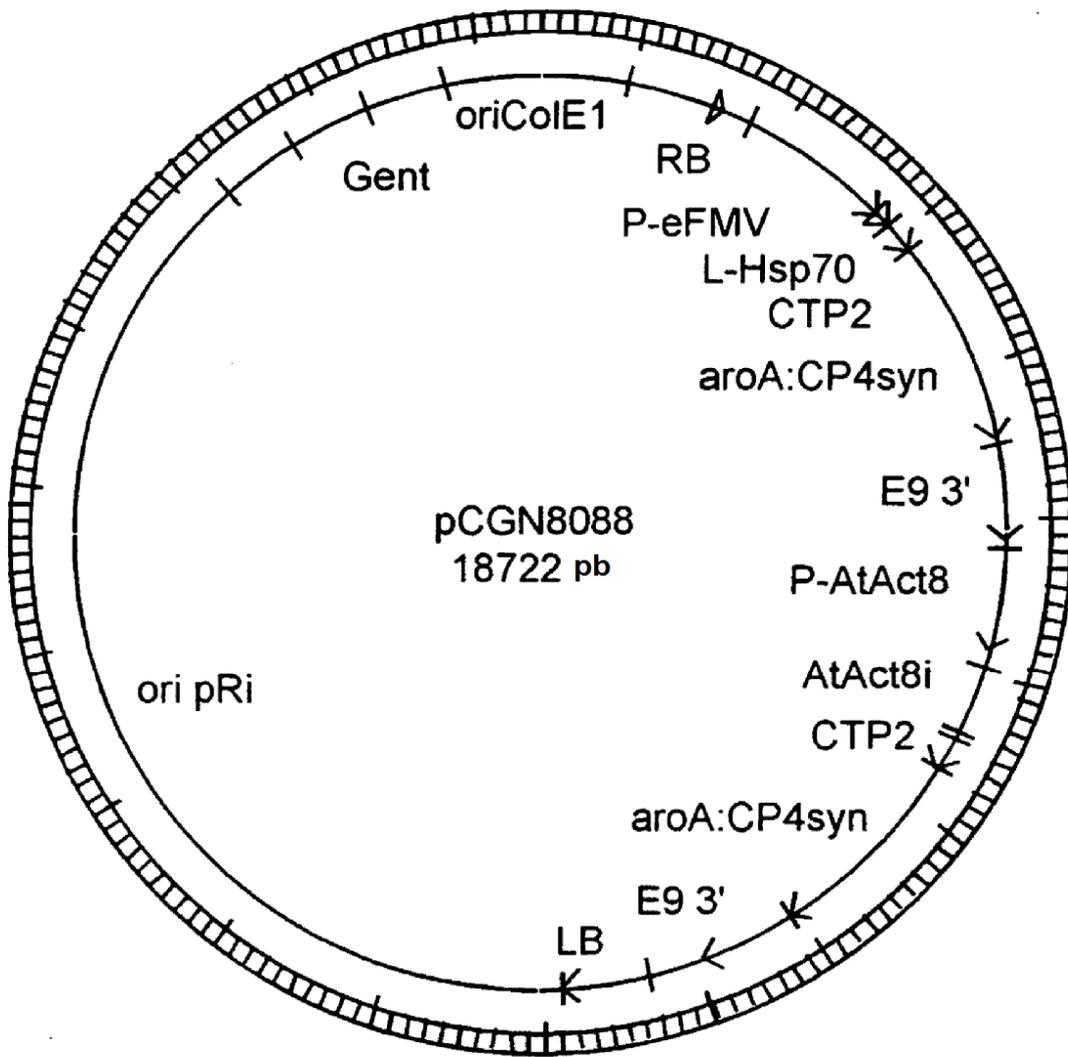


FIG. 8

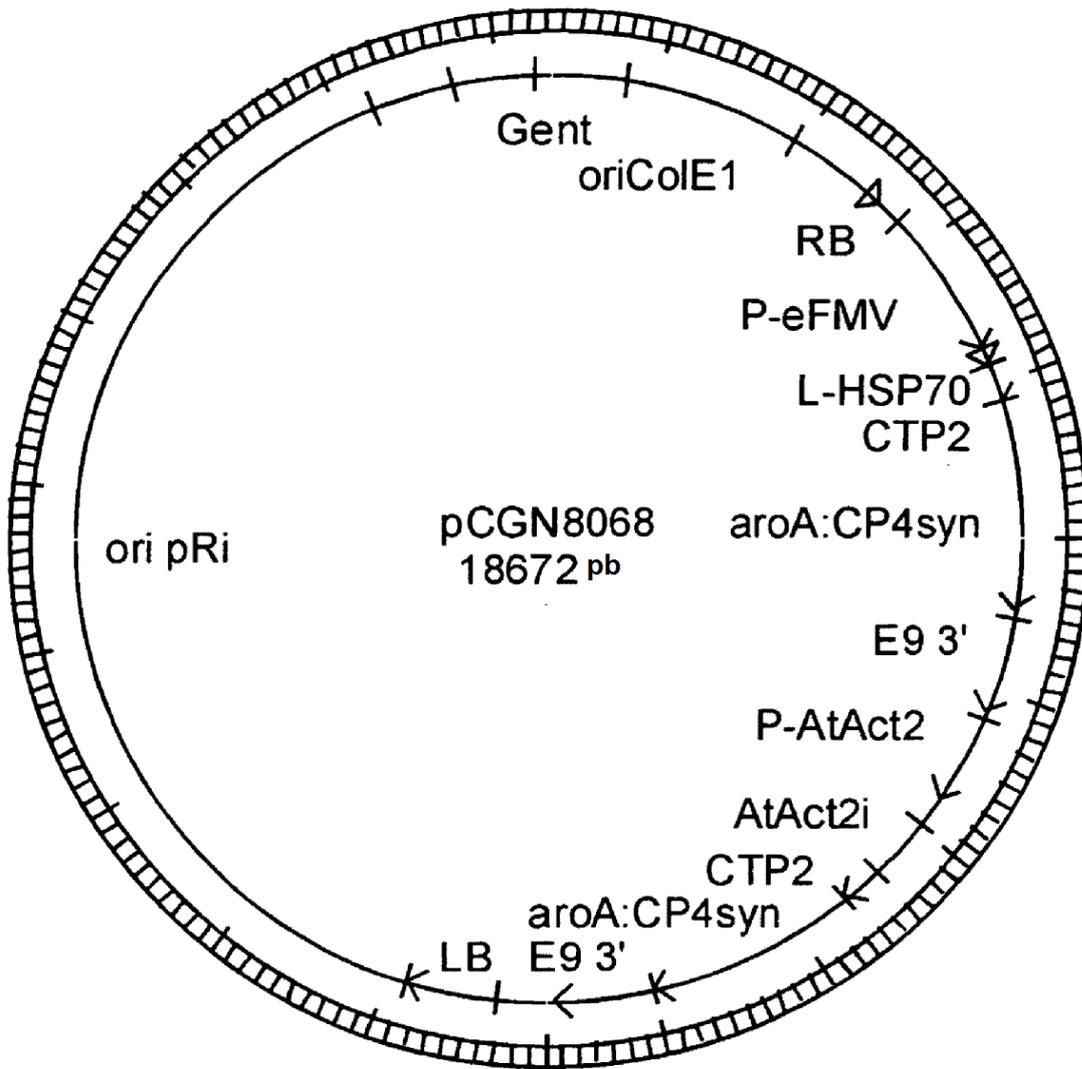


FIG. 9

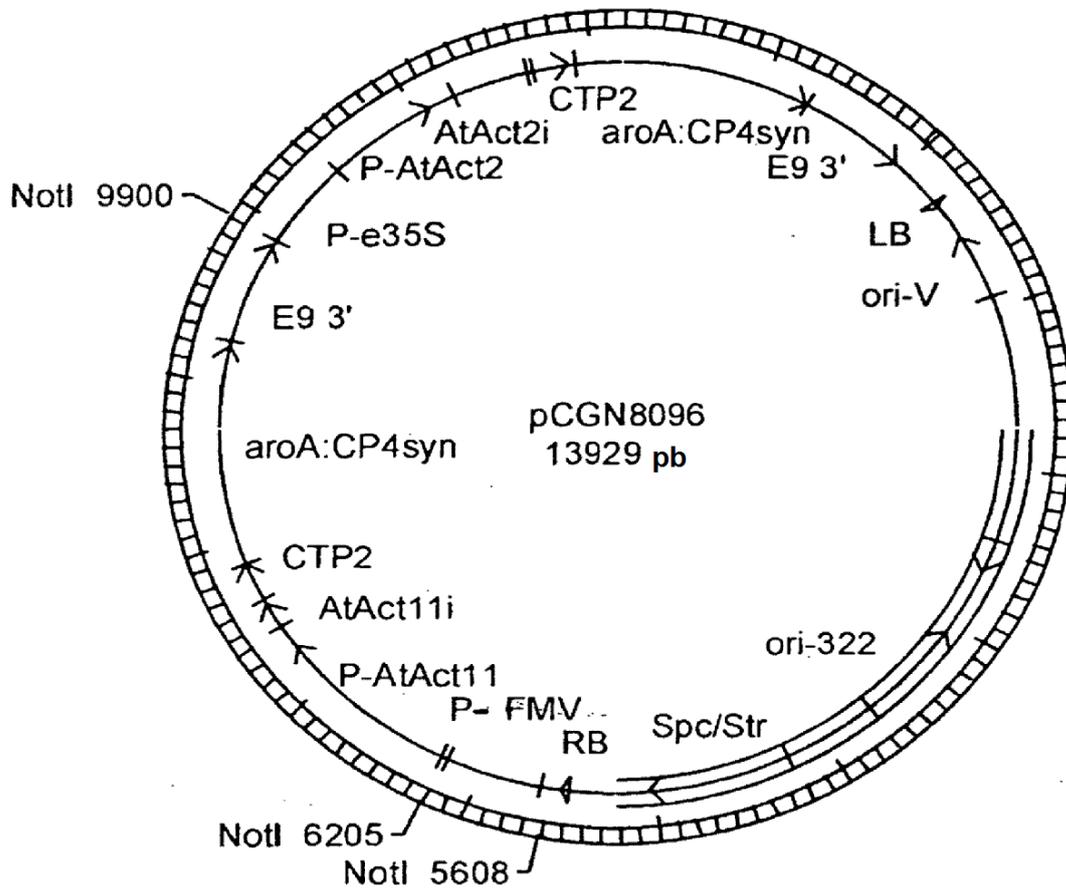


FIG. 10

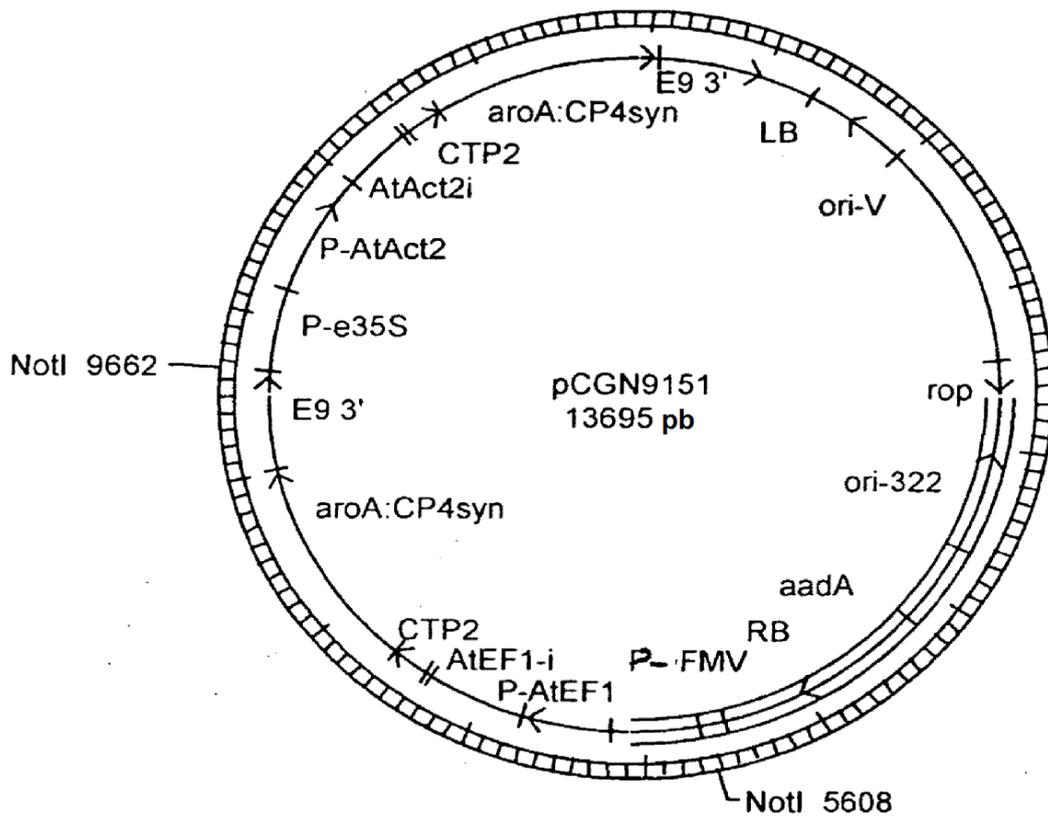


FIG. 11

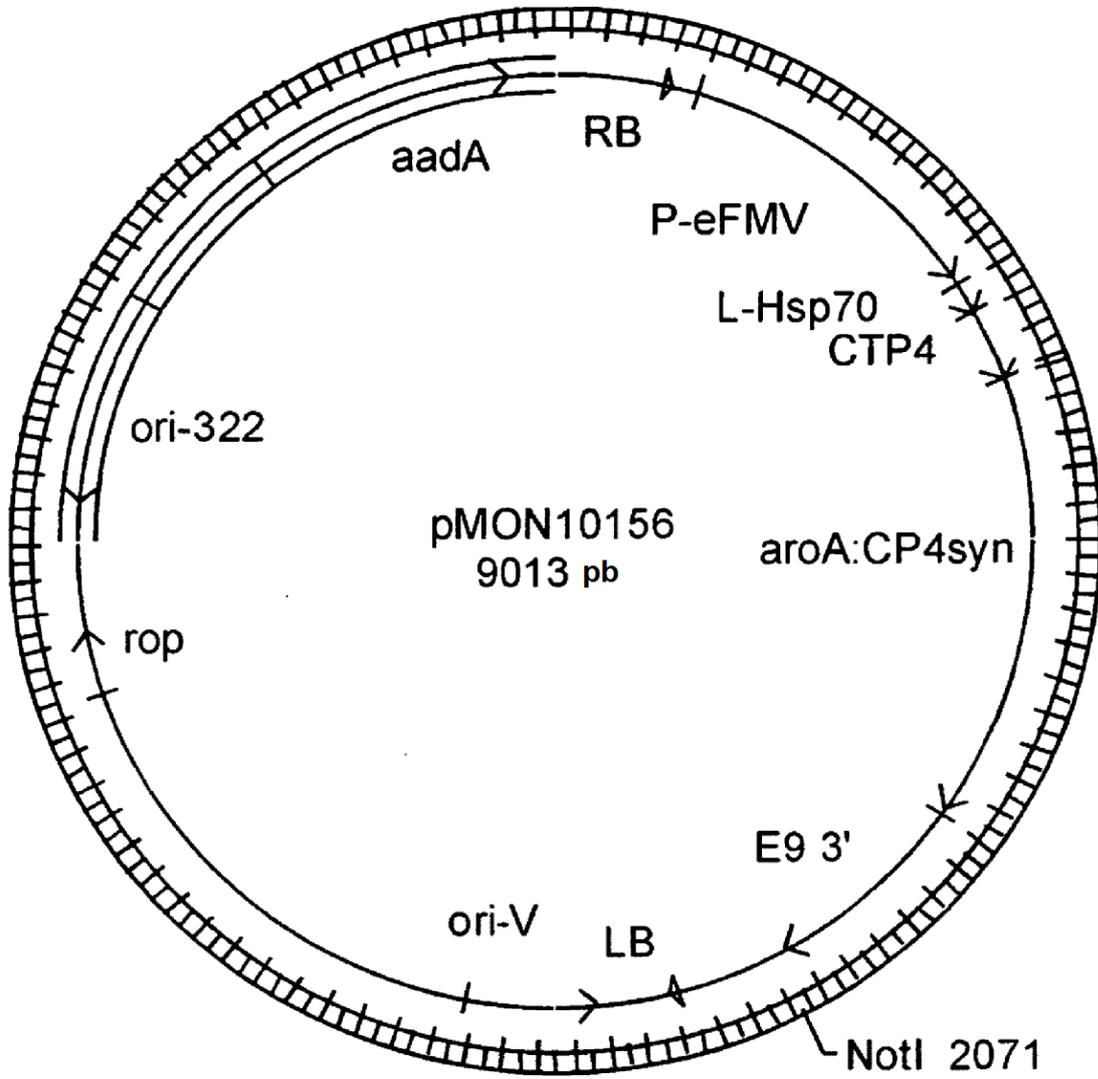


FIG. 12

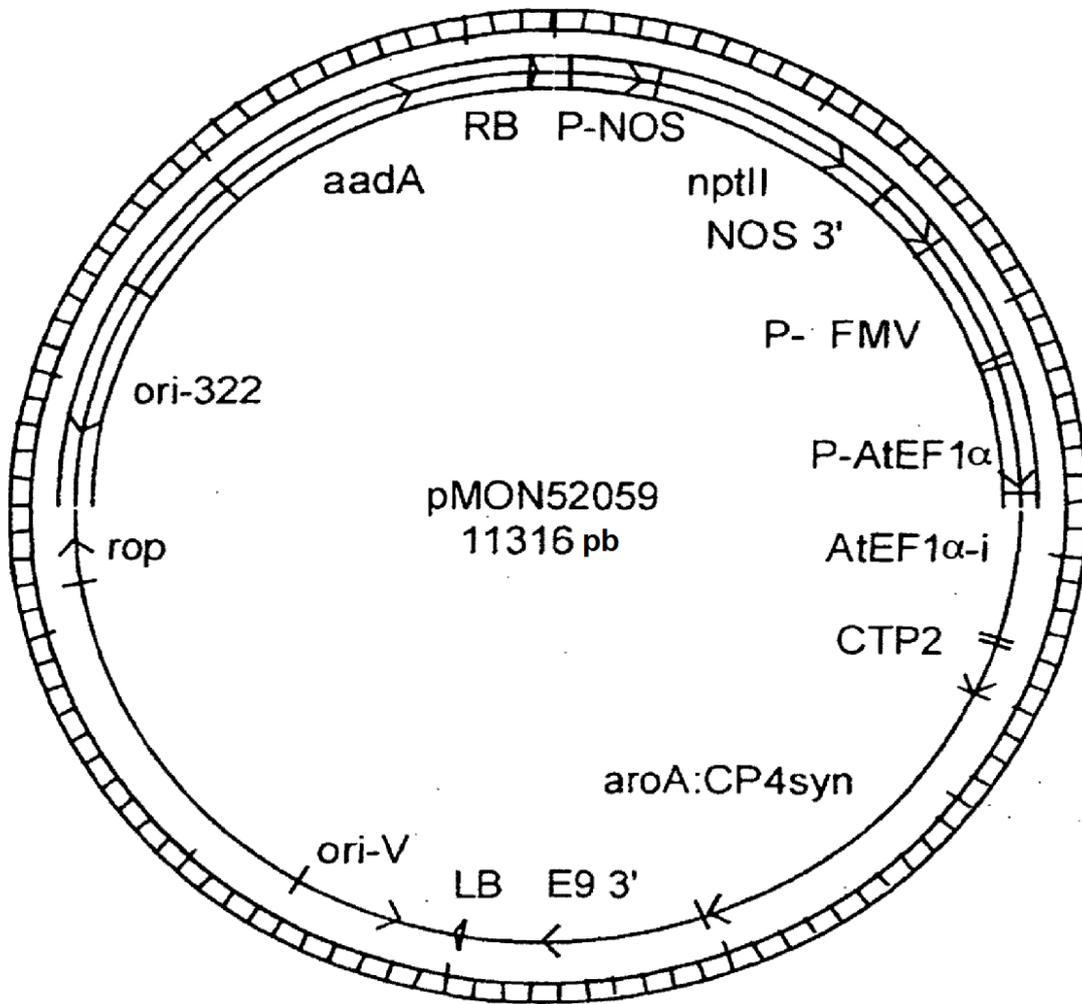


FIG. 13

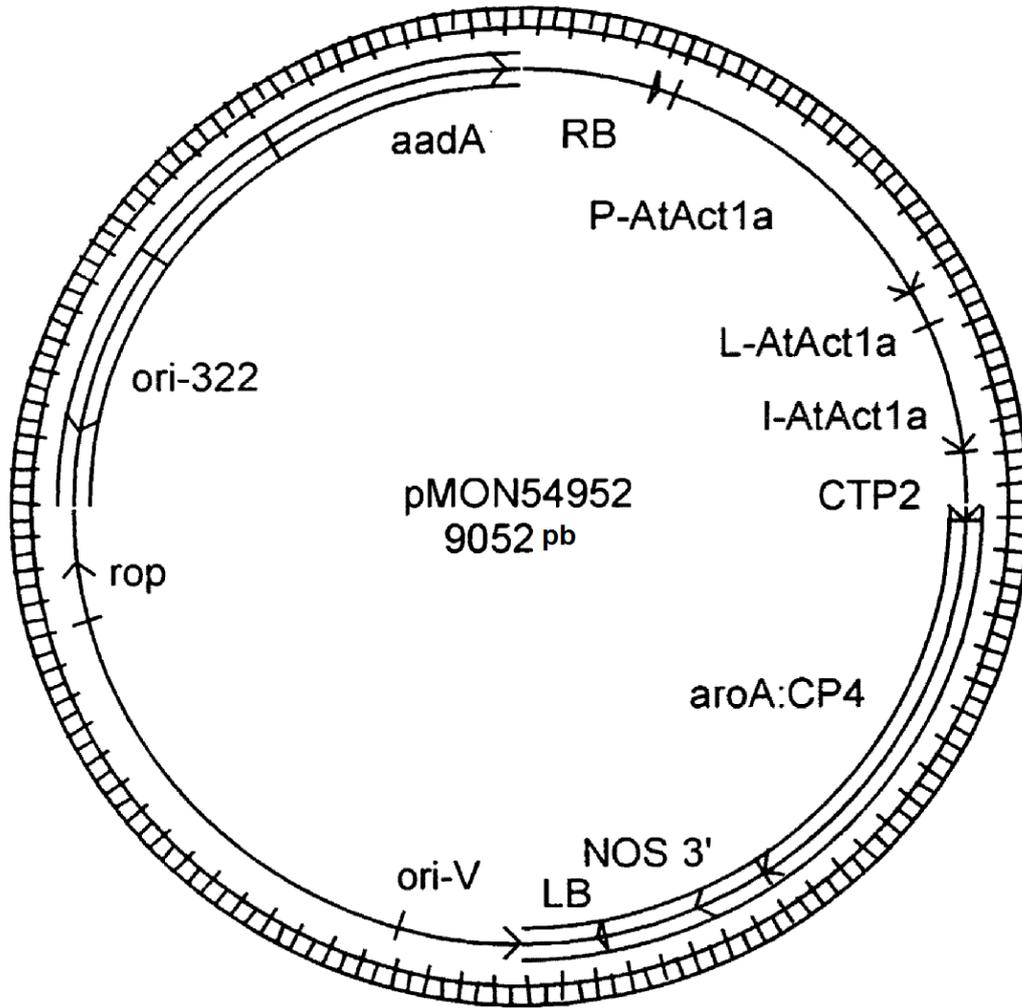


FIG. 14

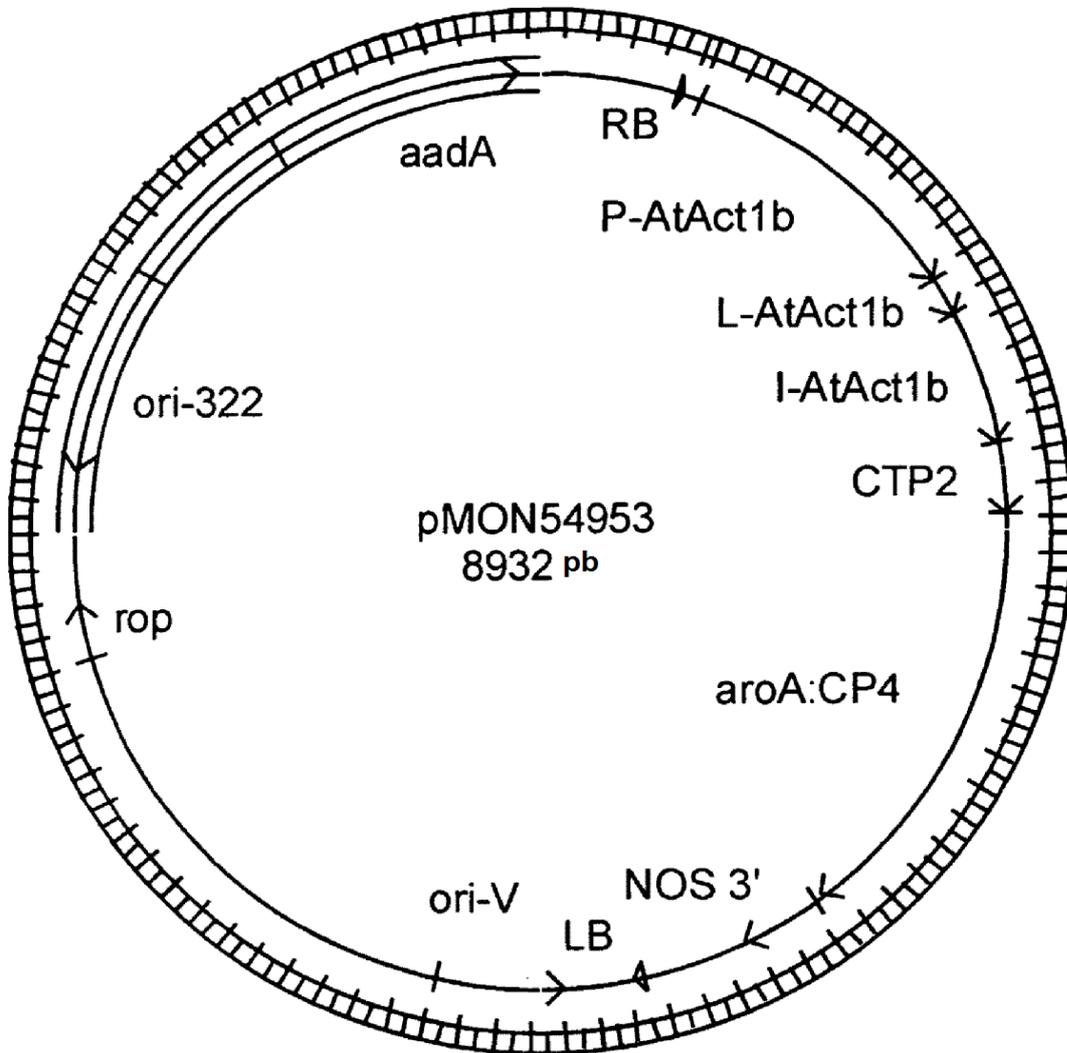


FIG. 15

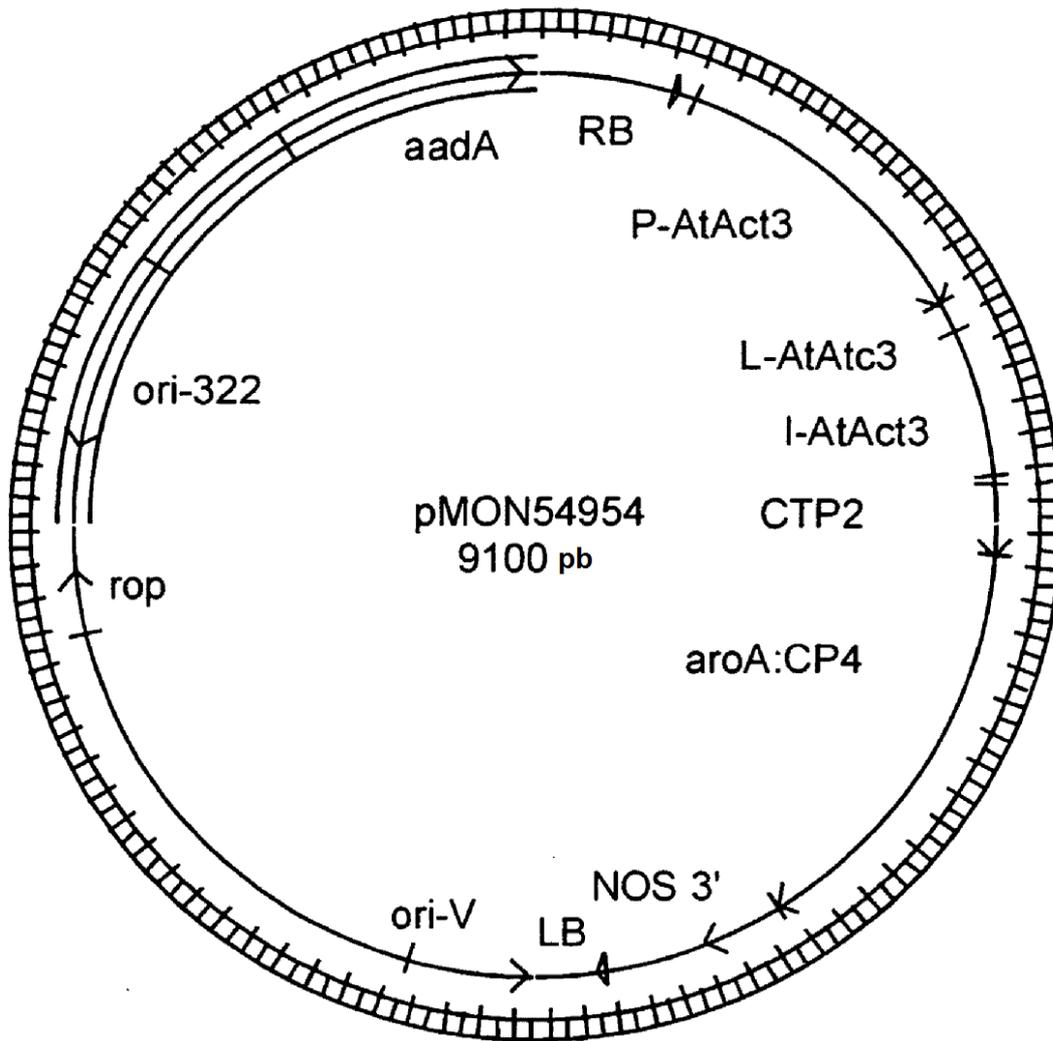


FIG. 16

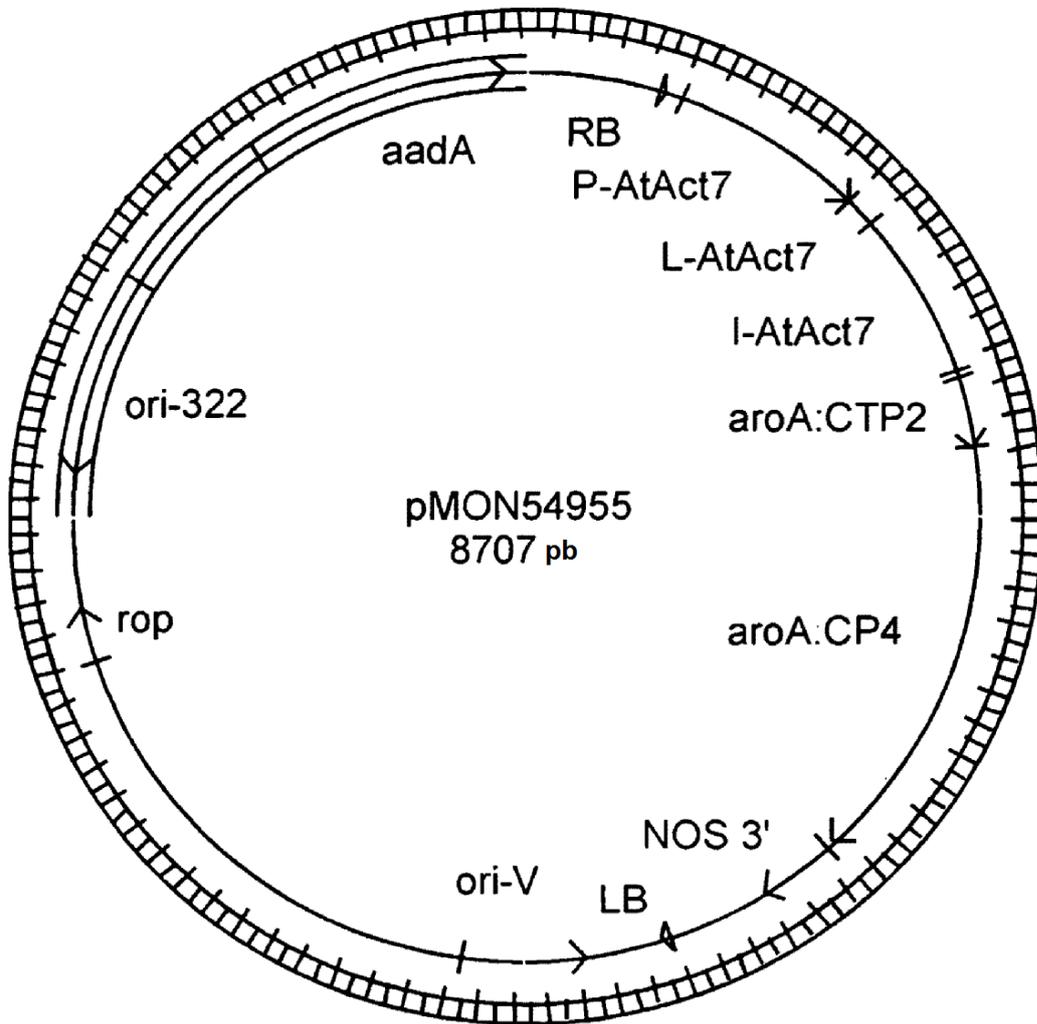


FIG. 17

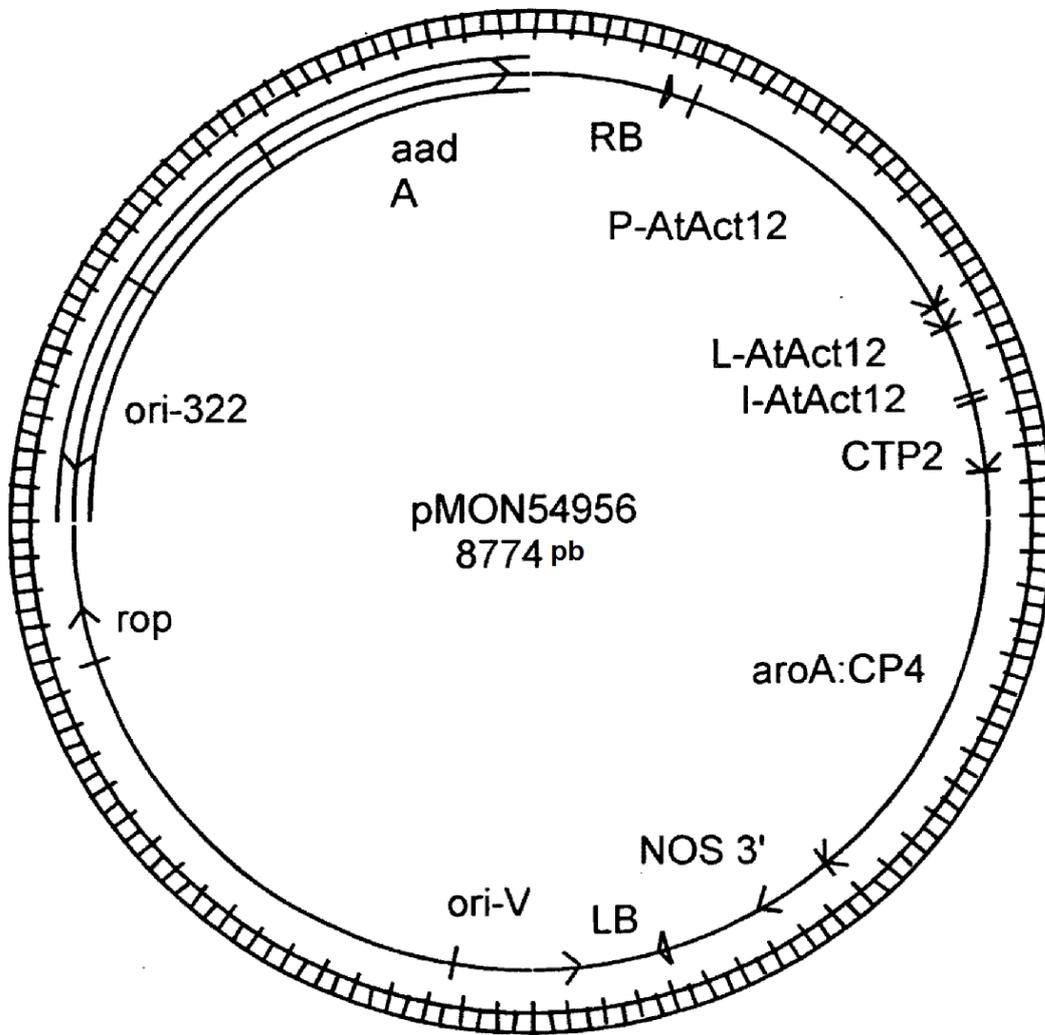


FIG. 18