

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 218**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2009 E 09729204 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 2262896**

54 Título: **Elementos reguladores de plantas y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**07.04.2008 US 42957**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**25.04.2014**

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)  
800 North Lindbergh Blvd.  
St. Louis, MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**FLASINSKI, STANISLAW y  
DIETRICH, CHARLES R.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 457 218 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

Elementos reguladores de plantas y usos de los mismos

### Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de la biología molecular de plantas y de la ingeniería genética de las plantas y a las moléculas de ADN útiles para la modulación de la expresión génica en plantas.

### Antecedentes

10 Los elementos reguladores son elementos genéticos que regulan la actividad de los genes mediante la modulación de la transcripción de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. Tales elementos incluyen promotores, líderes, intrones, y regiones 3' no traducidas y son útiles en el campo de la biología molecular de plantas y la ingeniería genética de las plantas. El documento US 2007/0130645 describe promotores de maíz que impulsan la expresión en, entre otros, las hojas.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevos elementos reguladores de mijo menor (*Setaria italica* (L.) Beauv) para su uso en plantas. En particular, la presente invención proporciona

15 (1) una molécula de ADN que comprende un elemento regulador que tiene una secuencia de ADN seleccionada de:

(a) una secuencia con al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con la longitud completa de una secuencia de ADN seleccionada de las SEC ID N° 1-2 con la actividad de promotor,

(b) una secuencia seleccionada de las SEC ID N° 1-2, y

20 (c) un fragmento que comprende al menos 95 nucleótidos contiguos de la secuencia de (a) o (b) con actividad de promotor,

en la que dicho elemento regulador está unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga;

25 (2) una construcción de ADN que comprende un elemento regulador que tiene una secuencia de ADN seleccionada de:

(a) una secuencia con al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con la longitud completa de una secuencia de ADN seleccionada de las SEC ID N° 1-2 con actividad de promotor,

(b) una secuencia seleccionada de las SEC ID N° 1-2, y

30 (c) un fragmento que comprende al menos 95 nucleótidos contiguos de la secuencia de (a) o (b) con actividad de promotor,

en el que dicho elemento regulador está unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga;

(3) una célula vegetal transgénica transformada de manera estable con la molécula de ADN como se define en (1) anteriormente;

35 (4) una planta transgénica transformada de manera estable con la molécula de ADN como se define en (1) anteriormente;

(5) una parte de planta de la planta transgénica de (4) anterior, en la que la parte de la planta comprende la molécula de ADN; y

(6) una semilla de la planta transgénica de (4) anterior, en la que la semilla comprende la molécula de ADN.

**Breve descripción de las figuras**

La **Figura 1** ilustra las tres variantes de promotor diseñadas a partir de los elementos reguladores del gen de la proteína de transferencia de lípidos. La SEC ID N° 15 es P-Setit.RCC3-1: 01:01 y tiene una longitud de 2.062 pares de bases nucleotídicos; la SEC ID N° 20 es P-Setit.RCC3-1: 01:11 y tiene una longitud de 915 pares de bases nucleotídicos, y la SEC ID N° 18 es P-Setit.RCC3-1: 1:10 y tiene una longitud de 1.563 pares de bases de nucleotídicos.

La **Figura 2** ilustra las dos variantes de promotor diseñadas a partir de los elementos reguladores del gen de la proteína similar a la metalotioneína. La SEC ID N° 5 es P-Setit.MthA-1: 01:01 y tiene una longitud de 483 pares de bases, la SEC ID N° 8 es P-Setit.MThB-1: 01:02 y tiene una longitud de 1.516 pares de bases.

Las **figuras 3A y 3B** ilustran colectivamente una alineación de secuencia producida utilizando la alineación de secuencias múltiples CLUSTAL W (1.82) de las dos variantes alélicas de los promotores del gen de la proteína relacionada con la deshidratación. En el consenso siguiente debajo de las secuencias alineadas, los apareamientos se marcan con "\*", los apareamientos erróneos se marcan con "." y las deleciones / inserciones están marcadas con "-". Las dos variantes alélicas tenían secuencias líder idénticas, pero las secuencias del promotor eran variantes de la secuencia cuando estaban alineadas. La SEC ID N° 10 es P-Setit.DRPA-1: 01:01 y la SEC ID N° 13 es p-Setit.DRPb-1: 01:01.

**Descripción detallada de la invención**

Las siguientes definiciones y procedimientos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos que se indique lo contrario, los términos y expresiones se deben entender según su uso convencional por los expertos en la técnica relevante.

**Moléculas de ADN**

Tal como se usa en el presente documento, el término "ADN" o la expresión "molécula de ADN" se refiere a una molécula de doble cadena de ADN de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases de desoxirribonucleótidos o una molécula de polinucleótido, léase desde el extremo 5' (cadena arriba) al extremo 3' (cadena abajo). Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de ADN" se refiere a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN. La nomenclatura utilizada en el presente documento es la requerida por el Título 37 del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos § 1.822, y se establece en las tablas en la Norma ST.25 de la OMPI (1998), Apéndice 2, Tablas 1 y 3.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de AND aislada" se refiere a una molécula de ADN al menos parcialmente separada de otras moléculas asociadas normalmente con ella en su estado nativo o natural. En una realización, el término "aislado" se refiere a una molécula de ADN que está al menos parcialmente separada de los ácidos nucleicos que normalmente flanquean a la molécula de ADN en su estado nativo o natural. Por lo tanto, las moléculas de ADN fusionadas a secuencias reguladoras o codificantes con las que no se asocian normalmente, por ejemplo como resultado de técnicas recombinantes, se consideran aisladas en el presente documento. Tales moléculas se consideran aisladas aun cuando se integren en el cromosoma de una célula huésped o estén presentes en una solución de ácido nucleico con otras moléculas de ADN.

Cualquier número de procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica se puede utilizar para aislar y manipular una molécula de ADN, o fragmento de la misma, divulgado en la presente invención. Por ejemplo, se puede usar la tecnología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar una molécula de ADN de partida en particular y / o para producir variantes de la molécula original. Moléculas de ADN, o fragmentos de la misma, también se pueden obtener mediante otras técnicas tales como mediante la síntesis directa del fragmento por medios químicos, como se practica habitualmente mediante el uso de un sintetizador automático de oligonucleótidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "identidad de secuencia" se refiere a la medida en la cual dos secuencias de polinucleótidos alineadas óptimamente son idénticas. Una alineación de secuencia óptima se crea mediante la alineación manual de dos secuencias, *por ejemplo*, una secuencia de referencia y otra secuencia, para maximizar el número de apareamientos de nucleótidos en la alineación de secuencia con inserciones, deleciones o huecos de nucleótidos internos adecuados. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia proporcionada como SEC ID N° 1-2.

Como se usa en el presente documento, la expresión "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje de identidad" o "% de identidad" es la fracción de identidad por 100. La "fracción de identidad" para una secuencia alineada óptimamente con una secuencia de referencia es el número de apareamientos de nucleótidos en la alineación óptima, dividido por el número total de nucleótidos en la secuencia de referencia, por ejemplo, el número total de nucleótidos en la longitud completa de la totalidad de la secuencia de referencia. Por lo tanto, una forma de

realización de la invención es una molécula de ADN que comprende una secuencia que cuando se alinea de manera óptima con una secuencia de referencia, proporcionada en el presente documento como la SEC ID N<sup>o</sup>: 1-2, tiene un 95 por ciento de identidad o superior, o al menos un 96 por ciento de identidad, un 97 por ciento identidad, un 98 por ciento de identidad o un 99 por ciento de identidad con la secuencia de referencia y tiene actividad reguladora de genes.

#### Elementos reguladores

Un elemento regulador es una molécula de ADN que tiene actividad de regulación génica es decir, uno que tiene la capacidad de afectar a la transcripción y / o traducción de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. La expresión "actividad reguladora de genes" se refiere a la capacidad de afectar el patrón de expresión de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente al afectar a la transcripción y / o la traducción de dicha molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. La actividad reguladora de genes puede ser positiva y / o negativa y el efecto se puede caracterizar por sus cualidades de temporal, espacial, de desarrollo, de tejido, de ciclo celular del medio ambiente fisiológico, patológica, y / o de respuesta químicamente así como por las indicaciones cuantitativas o cualitativas.

Los elementos reguladores tales como promotores, líderes, intrones y regiones de terminación de la transcripción son moléculas de ADN que tienen la actividad de regulación de genes y desempeñan un papel fundamental en la expresión global de genes en las células vivas. La expresión "elemento regulador" se refiere a una molécula de AND que tiene actividad de regulación de genes, es decir, uno que tiene la capacidad de afectar a la transcripción y / o la traducción de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. Elementos reguladores aislados, tales como promotores y líderes, que funcionan en plantas son por lo tanto útiles para la modificación de los fenotipos de las plantas a través de procedimientos de la ingeniería genética.

Los elementos reguladores se pueden caracterizar por su patrón de expresión, es decir, como constitutiva y / o por su patrón de expresión temporal, espacial, de desarrollo, de tejido, medioambiental, fisiológico, patológico, de ciclo celular y / o de respuesta química, y cualquier combinación de los mismos, así como por las indicaciones cuantitativas o cualitativas. Un promotor es útil como un elemento regulador para la modulación de la expresión de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente.

Como se usa en el presente documento, un "patrón de expresión génica" es cualquier patrón de transcripción de una molécula de ADN unida operativamente en una molécula de ARN transcrita. La expresión puede caracterizarse por sus cualidades de respuesta temporal, espacial, de desarrollo, de tejido, del medio ambiente, fisiológica,, ciclo celular patológica, y / química, así como por las indicaciones cuantitativas o cualitativas. La molécula de ARN transcrita puede traducirse para producir una molécula de proteína o puede proporcionar una molécula de ARN antisentido o reguladora de otro tipo, tal como un dsARN, un ARNt, ARNr y un un miARN.

Como se usa en el presente documento, el término "expresión proteica" es cualquier patrón de traducción de una molécula de ARN transcrita en una molécula de proteína. La expresión de la proteína se puede caracterizar por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo, o morfológicas, así como por las indicaciones cuantitativas o cualitativas.

Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere generalmente a una molécula de ADN que está implicada en el reconocimiento y unión de la ARN polimerasa 11 y otras proteínas (factores de transcripción de acción en trans) para iniciar la transcripción. Un promotor puede aislarse inicialmente a partir de la 'región no traducida en 5' (5' UTR) de una copia genómica de un gen. Como alternativa, los promotores pueden producirse sintéticamente o manipular moléculas de ADN. Los promotores también pueden ser quiméricos, es decir un promotor producido a través de la fusión de dos o más moléculas de ADN heterólogas. Los promotores útiles en la práctica de la presente invención incluyen la SEC ID N<sup>o</sup> 2 o fragmentos o variantes de la misma.

En una forma de realización, se proporcionan fragmentos de una secuencia promotora revelada en el presente documento. Los fragmentos promotores pueden exhibir actividad promotora, y pueden ser útiles solos o en combinación con otros promotores y fragmentos promotores, tales como en la construcción de promotores quiméricos. En realizaciones específicas, se proporcionan fragmentos de un promotor que comprenden al menos 95, 150, 250, 500, o 750 nucleótidos contiguos de una molécula de polinucleótido que tiene actividad promotora divulgada en el presente documento. Tales fragmentos pueden exhibir al menos un 95 por ciento, un 98 por ciento, o un 99 por ciento, o más, de identidad con una secuencia de referencia cuando se alinean óptimamente con la secuencia de referencia.

Un fragmento de promotor o promotor también puede analizarse para determinar la presencia de elementos promotores conocidos, es decir, características de secuencia de ADN, tales como una caja TATA y otros motivos de sitios de unión del factor de transcripción. La identificación de tales elementos promotores conocidos puede usarla un experto en la técnica para diseñar variantes del promotor que tengan un patrón de expresión similar al promotor inicial.

Como se usa en el presente documento, el término "potenciador" o "elemento potenciador" se refiere a un elemento regulador de la transcripción que actúa en cis, también conocido como elemento cos, que confiere un aspecto del patrón de expresión global, pero es generalmente insuficiente por sí solo para conducir la transcripción, de un secuencia de polinucleótidos unida operativamente. A diferencia de los promotores, los elementos potenciadores no suelen incluir un sitio de inicio de la transcripción (TSS) o caja TATA. Un promotor puede comprender, naturalmente, uno o más elementos potenciadores que afectan la transcripción de una secuencia de polinucleótido unido operativamente. Un elemento potenciador aislado también puede estar fusionado a un promotor para producir un promotor quimérico elemento cis, que confiere un aspecto de la modulación global de la expresión génica. Un fragmento de promotor o promotor puede comprender uno o más elementos potenciadores que afectan la transcripción de los genes unidos operativamente. Se cree que muchos elementos potenciadores del promotor se unen a las proteínas de unión al ADN y / o afectan a la topología del ADN, produciendo conformaciones locales que permiten selectivamente o restringen el acceso de la ARN polimerasa al molde de ADN o que facilitan la apertura selectiva de la doble hélice en el sitio de iniciación de la transcripción. Un elemento potenciador puede funcionar para unir factores de transcripción que regulan la transcripción. Algunos elementos potenciadores se unen a más de un factor de transcripción, y los factores de transcripción pueden interactuar con diferentes afinidades con más de un dominio potenciador. Los elementos potenciadores pueden identificarse mediante un número de técnicas, incluyendo análisis de delección, *es decir*, la delección de uno o más nucleótidos desde el extremo 5' o interno a un promotor; análisis proteico de unión a ADN utilizando la huella de DNasa I, interferencia de la metilación, ensayos de movilidad en electroforesis - desplazamiento, huella genómica *in vivo* mediante PCR mediada por ligación, y otros ensayos convencionales; o mediante análisis de la similitud de la secuencia de ADN utilizando motivos elementos cis conocidos o elementos potenciadores como una secuencia diana o un motivo diana con los procedimientos de comparación de secuencias de ADN convencionales, tales como BLAST. La estructura fina de un dominio potenciador se puede estudiar adicionalmente por mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o por otros procedimientos convencionales. Los elementos potenciadores se pueden obtener por síntesis química o por aislamiento de elementos reguladores que incluyen tales elementos, y se pueden sintetizar con nucleótidos flanqueantes adicionales que contengan sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar la manipulación subsecuencia. Por lo tanto, el diseño, construcción, y el uso de elementos potenciadores de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento para modular la expresión de las moléculas de polinucleótidos transcribibles unidas operativamente están abarcados en la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "líder" se refiere a una molécula de ADN aislada de la región 5' no traducida (5' UTR) de una copia genómica de un gen y se define generalmente como un segmento de nucleótidos entre el sitio de inicio de transcripción (TSS) y el sitio de inicio de la secuencia de codificación de la proteína. Como alternativa, los líderes pueden producirse sintéticamente o manipular elementos de ADN. Un líder puede usarse como un elemento regulador en 5' para modular la expresión de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. Las moléculas líder pueden usarse con un promotor heterólogo o con su promotor nativo. Por tanto, las moléculas promotoras de la presente invención pueden estar unidas operativamente a su líder nativo o pueden unirse operativamente a un líder heterólogo. Líderes útiles en la práctica de la presente invención incluyen la SEC ID N° 3, 6, 11, y 16 o fragmentos o variantes de las mismas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "quimérico" se refiere a una molécula de ADN única producida por la fusión de una primera molécula de ADN a una segunda molécula de ADN, donde ni la primera ni la segunda molécula de ADN normalmente se encontrarían en esa configuración, *es decir*, fusionado a la otra. La molécula de ADN quimérico es, pues, una nueva molécula de ADN que, de otro modo, no se encuentra normalmente en la naturaleza. Como se usa en el presente documento, el término "promotor quimérico" se refiere a un promotor producido a través de dicha manipulación de moléculas de ADN. Un promotor quimérico puede combinar dos o más fragmentos de ADN; un ejemplo sería la fusión de un promotor para un elemento potenciador. Por lo tanto, el diseño, construcción, y el uso de promotores quiméricos de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento para modular la expresión de las moléculas de polinucleótidos transcribibles unidas operativamente son abarcados por la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a una segunda molécula de ADN que tiene una composición similar, pero no idéntica, a la de una primera molécula de ADN y, sin embargo la segunda molécula de ADN todavía mantiene la funcionalidad general, *es decir*, el mismo patrón de expresión o uno similar, de la primera molécula de ADN. Una variante puede ser una versión más corta o truncada de la primera molécula de ADN y / o una versión alterada de la secuencia de la primera molécula de ADN, tal como uno con diferentes sitios de enzimas de restricción y / o deleciones, sustituciones, y / o inserciones internas. En la presente invención, una secuencia de polinucleótidos proporcionada como SEC ID N° 1-20 se puede utilizar para crear variantes que tienen una composición similar, pero no idéntica a, la secuencia de polinucleótido del elemento regulador original, mientras que todavía mantiene la funcionalidad general, *es decir*, el mismo patrón de expresión o uno similar, del elemento regulador original. La producción de tales variantes de la presente invención está bien dentro de la experiencia ordinaria de la técnica a la luz de la divulgación y se incluye dentro del alcance de la presente invención.

Construcciones

Como se usa en el presente documento, el término "construcción" se refiere a cualquier molécula de polinucleótido recombinante, tal como un plásmido, cósmido, virus, molécula de polinucleótido de replicación autónoma, fago, o molécula de polinucleótido de AND o de ARN lineal o circular, monocatenaria o bicatenaria, derivada de cualquier fuente, capaz de integrarse en el genoma o poseer replicación autónoma, que comprende una molécula de polinucleótido en la que una o más moléculas de polinucleótido se han relacionado de una manera funcionalmente operativa, es decir, unida operativamente. Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a cualquier construcción de polinucleótido recombinante que puede usarse para el propósito de la transformación, es decir, la introducción de ADN heterólogo en una célula huésped.

Como se usa en el presente documento, la expresión "unido operativamente" se refiere a una primera molécula unida a una segunda molécula, en la que las moléculas están dispuestas de modo que la primera molécula afecta a la función de la segunda molécula. Las dos moléculas pueden o no ser parte de una sola molécula contigua y pueden o pueden no ser adyacentes. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible si el promotor modula la transcripción de la molécula de polinucleótido transcribible de interés en una célula.

Las construcciones de la presente invención son generalmente plásmido Ti construcciones dobles de ADN de frontera que tienen el borde derecho (RB o AGRtu.RB) y el borde izquierdo (LB o AGRtu.LB) regiones del plásmido Ti aislado a partir de *Agrobacterium tumefaciens* que comprende un ADN-T, que junto con moléculas de transferencia proporcionada por el *Agrobacterium tumefaciens* células, permitir la integración de T-ADN en el genoma de una célula vegetal (Ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6,603,061). Las construcciones también pueden contener los segmentos de ADN plásmido de cadena principal que proporcionan la función de replicación y selección de antibióticos en células bacterianas, por ejemplo, un origen de replicación de una *Escherichia coli*, tales como *ori322*, un origen de la replicación de varios huéspedes, como *oriV* o *oriRi*, y una región codificante para un marcador seleccionable tal como Spec / Strp que codifica para la Tn7 aminoglicosido adeniltransferasa (*aadA*) que confiere resistencia a la espectinomicina o estreptomycin, o un gen marcador seleccionable de gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación de plantas, la cepa bacteriana huésped es a menudo *Agrobacterium tumefaciens* ABI, C58 o LBA4404, sin embargo, otras cepas conocidas por los expertos en la técnica de transformación de la planta pueden funcionar en la presente invención.

En la técnica se conocen técnicas para el ensamblaje e introducción de construcciones en una célula de tal manera que la molécula de polinucleótido transcribible se transcribe en una molécula de ARNm funcional que se traduce y se expresa como un producto proteico. Para la práctica de la presente invención, composiciones y procedimientos para preparar y usar construcciones y células huésped convencionales son bien conocidos para un experto en la técnica, ver, Por ejemplo, Clonación molecular: A Laboratory Manual, tercera edición Volúmenes 1, 2 y 3 (2000) JF Sambrook, DW Russell y N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Los procedimientos para preparar vectores recombinantes particularmente adecuado para la transformación de plantas incluyen, sin limitación, los descritos en N° de patente de EE.UU.4,971,908; 4,940,835; 4,769,061; Y 4,757,011 en su totalidad. Estos tipos de vectores también se han revisado en la literatura científica (ver, Por ejemplo, . Rodríguez, et al, Vectors: A Survey of Molecular Clonación Vectores y sus usos, Butterworths, Boston, (1988) Y Glick, et al., Methods in Plant Biología Molecular y Biotecnología, CRC Press, Boca Raton, FL. (1993)). Los vectores típicos útiles para la expresión de ácidos nucleicos en plantas superiores son bien conocidos en la técnica e incluyen vectores derivados del (Ti) plásmido inductor de tumores de *Agrobacterium tumefaciens* (Rogers, et al, Methods in Enzymology, 153: 253-277 (1987)). Otros vectores recombinantes útiles para la transformación de plantas, incluyendo el vector de control de transferencia pCaMVN, también se han descrito en la literatura científica (Ver, Por ejemplo, Fromm, et al., Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU., 82: desde 5824 hasta 5828 (1.985)).

Varios elementos reguladores pueden ser incluidos en una construcción. Cualquiera de estos elementos reguladores pueden proporcionarse en combinación con otros elementos reguladores. Estas combinaciones pueden diseñarse o modificarse para producir características deseables reguladoras. Las construcciones de la presente invención habitualmente estarán compuestas por al menos un elemento regulador unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente a una "molécula de terminación de la transcripción 3'.

Las construcciones de la presente invención pueden incluir cualquier promotor o líder conocido en la técnica. Por ejemplo, un promotor de la presente invención puede unirse operativamente a un líder heterólogo no traducido en 5', tales como uno derivado de un gen de la proteína de choque térmico (véase, por ejemplo, N° de patente de EE.UU.5,659,122 y 5,362,865). Como alternativa, un líder de la presente invención puede unirse operativamente a un promotor heterólogo tal como el promotor de transcripción 35S del virus del mosaico de la coliflor (ver, N° de patente de EE.UU.5,352,605).

Como se usa en el presente documento, el término "intrón" se refiere a una molécula de ADN que puede ser aislado o identificado de la copia genómica de un gen y se puede definir generalmente como una región empalmada a cabo durante el procesamiento de ARNm antes de la traducción. Como alternativa, un intrón puede ser un elemento de ADN producido sintéticamente o manipulado. Un intrón puede contener elementos de potenciadores que afectan la transcripción de los genes unidos operativamente. Un intrón puede ser usado como un elemento regulador para modular la expresión de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. Una construcción de ADN puede comprender un intrón, y la introducción puede o no puede ser heterólogo con respecto a

la secuencia de molécula de polinucleótido transcribible. Los ejemplos de intrones en la técnica incluyen el intrón de actina de arroz (Nº de patente de EE.UU.5,641,876) Y el intrón de HSP70 de maíz (Nº de patente de EE.UU.5,859,347).

5 Como se usa en el presente documento, el término "3' de la transcripción molécula de terminación" o "3' UTR" se refiere a una molécula de ADN que se utiliza durante la transcripción para producir 'región no traducida (3' UTR de la 3) de una molécula de ARNm. La región 3' no traducida de una molécula de ARNm puede ser generado por la escisión específica y 3' de poliadenilación, también conocido como cola de poliA. Un UTR 3' puede ser unido operativamente a y situado aguas abajo de una molécula de polinucleótido transcribible y puede incluir polinucleótidos que proporcionan una señal de poliadenilación y otras señales reguladoras capaces de afectar a la transcripción, el procesamiento del mRNA, o la expresión de genes. PolyA colas se cree que la función en la estabilidad del ARNm y en la iniciación de la traducción. Ejemplos de 3' moléculas de terminación de la transcripción en la técnica son la nopalina sintasa 3' región (ver, Fraley, et al., Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU., 80: 4803 hasta 4807 (1.983)); Hsp17 trigo 'región; rubisco del guisante subunidad pequeña 3' 3' región; E6 algodón región 3' (U.S. Patent 6,096,950); regiones 3' se describe en W00011200A2, Y la coixina 3' UTR (Nº de patente de EE.UU.6,635,806).

Las construcciones y vectores también pueden incluir un péptido de tránsito secuencia que expresa un péptido relacionado que es útil para la orientación de un producto proteico, en particular a un cloroplasto, leucoplast, u otro orgánulo de plástidos de codificación; mitocondrias; peroxisomas; vacuola, o una ubicación extracelular. Para las descripciones de la utilización de péptidos de tránsito del cloroplasto, véase Nº de patente de EE.UU.5,188,642 y Nº de patente de EE.UU.5,728,925. Muchas proteínas de cloroplastos-localizada se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se dirigen al cloroplasto mediante un péptido de tránsito al cloroplasto (CTP). Ejemplos de tales proteínas de cloroplastos aislados incluyen, pero no se limitan a, aquellos asociados con la subunidad pequeña (SSU) de la ribulosa-1, 5 carboxilasa,-bisfosfato, ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, el complejo proteína captador de luz I y la proteína II, tiorredoxina M, enolpiruvil siquimato fosfato sintasa (EPSPS), y péptidos de tránsito descritos en Nº de patente de EE.UU.7,193,133. Se ha demostrado *in vivo* y *in vitro* que las proteínas no pueden ser objeto del cloroplasto al cloroplasto mediante el uso de proteínas de fusión con un CTP heteróloga y que la CTP es suficiente para dirigir una proteína al cloroplasto. Incorporación de un péptido de tránsito al cloroplasto adecuado tal como el *Arabidopsis thaliana* EPSPS CTP (CTP2) (Ver, Klee et al., Mol. Gen. . Genet, 210:437-442 (1987)) O la *Petunia hybrida* CTP de la EPSPS (CTP4) (Ver, della-Cioppa et al., Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU., 83:6873-6877 (1986)) Ha sido mostrar a dirigir las secuencias de proteínas EPSPS heterólogos a los cloroplastos en plantas transgénicas (Ver, Patentes de EE.UU. Nº 5,627,061; 5,633,435; y 5,312,910 y EP 0218571; EP 189707; EP 508909; Y EP 924299).

#### Moléculas de polinucleótido transcribible

35 Como se usa en el presente documento, el término "molécula de polinucleótido transcribible" se refiere a cualquier molécula de ADN capaz de transcribirse en una molécula de ARN, incluyendo, pero no limitado a, aquellos que tienen secuencias de codificación de proteínas y los que tienen secuencias útiles para la supresión del gen. Un "transgén" se refiere a una molécula de polinucleótido transcribible heterólogo a una célula huésped y / o una molécula de polinucleótido transcribible incorporado artificialmente en el genoma de una célula huésped.

40 Un promotor de la presente invención puede estar unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible que es heterólogo con respecto a la molécula de promotor. Como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" se refiere a la combinación de dos o más moléculas de polinucleótido que cuando una combinación de tales normalmente no se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, las dos moléculas pueden ser derivadas de diferentes especies y / o las dos moléculas se pueden derivar de diferentes genes, *por ejemplo*, diferentes genes de la misma especie o los mismos genes de diferentes especies. Un promotor es por lo tanto heterólogo con respecto a una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente si tal combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza, *o* molécula de polinucleótido transcribible que no es de origen natural unida operativamente en combinación con esa molécula promotor.

45 La molécula de polinucleótido transcribible puede generalmente ser cualquier molécula de ADN para el que se desea la expresión de un transcrito de ARN. Tal expresión de un transcrito de ARN puede resultar en la traducción de la molécula de ARNm resultante y por lo tanto la expresión de proteínas. Como alternativa, una molécula de polinucleótido transcribible puede estar diseñado para provocar en última instancia, disminución de la expresión de un gen o proteína específica. Esto se puede lograr mediante el uso de una molécula de polinucleótido transcribible que está orientado en la dirección antisentido. Un experto normal en la técnica está familiarizado con el uso de tal tecnología antisentido. Brevemente, como la molécula de polinucleótido transcribible antisentido se transcribe, el producto de ARN se hibrida a y secuestra una molécula de ARN complementario dentro de la célula. Esta molécula de ARN dúplex no puede ser traducido a una proteína por la maquinaria de traducción de la célula y se degrada en la célula. Cualquier gen puede regularse negativamente de esta manera.

50 Por lo tanto, una forma de realización de la invención es un elemento regulador de la presente invención, tales como los proporcionados como SEC ID Nº 1-2, unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible a fin de modular la transcripción de la molécula de polinucleótido transcribible a un nivel deseado o en un patrón deseado

después de la introducción de dicha construcción en una célula vegetal. En una realización, la molécula de polinucleótido transcribible comprende una región codificante de la proteína de un gen, y el promotor afecta a la transcripción de una molécula de ARN que se traduce y se expresa como un producto proteico. En otra realización, la molécula de polinucleótido transcribible comprende una región antisentido de un gen, y el promotor afecta a la transcripción de una molécula de ARN antisentido u otra molécula de ARN inhibidora similares con el fin de inhibir la expresión de una molécula de ARN específica de interés en una célula huésped diana.

#### Genes de interés agrónomo

Moléculas de polinucleótido transcribible pueden ser genes de interés agrónomico. Como se usa en el presente documento, la expresión "gen de interés agrónomico" se refiere a una molécula de polinucleótido transcribible que cuando se expresa en un tejido particular de la planta, célula, o tipo de célula proporciona una característica deseable asociada con la morfología de la planta, la fisiología, crecimiento, desarrollo, rendimiento, producto, el perfil nutricional, enfermedad o resistencia a las plagas, y / o tolerancia del medio ambiente o química. Los genes de interés agrónomico incluyen, pero no se limitan a, las que codifican una proteína de rendimiento, una proteína de resistencia al estrés, una proteína de control de desarrollo, una proteína de la diferenciación de tejidos, una proteína de meristemo, una proteína sensible con el medio ambiente, una proteína de la senescencia, una proteína sensible a la hormona, una proteína de la abscisión, una proteína de fuente, una proteína fregadero, una proteína de control de flor, una proteína de la semilla, una proteína de resistencia a los herbicidas, una proteína de resistencia a las enfermedades, una enzima de biosíntesis de ácido graso, una enzima biosintética de tocoferol, una enzima de biosíntesis de aminoácidos, una proteína pesticida, o cualquier otro agente, tal como un antisentido o ARNi molécula dirigida a diana un gen particular para la supresión. El producto de un gen de interés agrónomico puede actuar dentro de la planta con el fin de causar un efecto sobre la fisiología de las plantas o el metabolismo o puede ser actuar como un agente plaguicida en la dieta de una plaga que se alimenta de la planta.

En una forma de realización de la invención, un promotor de la presente invención se incorpora en una construcción tal que el promotor está unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible que es un gen de interés agrónomico. La expresión del gen de interés agrónomico es deseable con el fin de conferir un rasgo agrónomicamente beneficioso. Una característica agrónomico beneficioso puede ser, por ejemplo, pero no limitado a, tolerancia a los herbicidas, control de insectos, rendimiento modificado, resistencia a enfermedades por hongos, resistencia a virus, resistencia a los nematodos, resistencia a enfermedad bacteriana, crecimiento y desarrollo de la planta, la producción de almidón, producción de aceites modificados, de producción de alto aceite, contenido de ácidos grasos modificado, de producción alta en proteínas, maduración de los frutos, el aumento de la nutrición animal y humana, biopolímeros, la resistencia al estrés ambiental, péptidos farmacéuticos y péptidos secretables, características mejoradas de procesamiento, digestibilidad mejorada, la producción de enzimas, el sabor, la fijación de nitrógeno, híbridos producción de semillas, la producción de fibras, y la producción de biocombustibles. Ejemplos de genes de interés agrónomico conocido en la técnica incluyen los de resistencia a los herbicidas (Nº de patente de EE.UU.6,803,501; 6,448,476; 6,248,876; 6,225,1.14; 6,107,549; 5,866,775; 5,804,425; 5,633,435; Y 5,463,175), Aumento del rendimiento (Patentes de EE.UU. Nº USRE38,446; 6,716,474; 6,663,906; 6,476,295; 6,441,277; 6,423,828; 6,399,330; 6,372,211; 6,235,971; 6,222,098; Y 5,716,837), el control de insectos (Patentes de EE.UU. Nº 6,809,078; 6,713,063; 6,686,452; 6,657,046; 6,645,497; 6,642,030; 6,639,054; 6,620,988; 6,593,293; 6,555,655; 6,538,109; 6,537,756; 6,521,442; 6,501,009; 6,468,523; 6,326,351; 6,313,378; 6,284,949; 6,281,016; 6,248,536; 6,242,241; 6,221,649; 6,177,615; 6,156,573; 6,153,814; 6,110,464; 6,093,695; 6,063,756; 6,063,597; 6,023,013; 5,959,091; 5,942,664; 5,942,658, 5,880,275; 5,763,245; Y 5,763,241), resistencia a enfermedades fúngicas (Patentes de EE.UU. Nº 6,653,280; 6,573,361; 6,316,407; 6,215,048; 5,516,671; 5,773,696; 6,121,436; 6,316,407; y 6,506,962), Resistencia a virus (Patentes de EE.UU. Nº 6,617,496; 6,608,241; 6,015,940; 6,013,864; 5,850,023; y 5,304,730), Resistencia a nematodos (Nº de patente de EE.UU.6,228,992), resistencia a la enfermedad bacteriana (Nº de patente de EE.UU.5,516,6711), crecimiento y desarrollo de plantas (patentes de EE.UU. Nº 6,723,897 y 6,518,488), producción de almidón (patentes de EE.UU. Nº 6,538,181; 6,538,179; 6,538,178; 5,750,876; 6,476,295), producción de aceites modificados (patentes de EE.UU. Nº 6,444,876; 6,426,447; y 6,380,462), producción de aceites altos (patentes de EE.UU. Nº 6,495,739; 5,608,149; 6,483,008; y 6,476,295), cotenido modificado en ácidos grasos (patentes de EE.UU. Nº 6,828,475; 6,822,141; 6,770,465; 6,706,950; 6,660,849; 6,596,538; 6,589,767; 6,537,750; 6,489,461; y 6,459,018), producción de alto valor proteico (Nº de patente de EE.UU.6,380,466), maduración del fruto (Nº de patente de EE.UU.5,512,466), aumento de la nutrición animal y humana (patentes de EE.UU. Nº 6,723,837; 6,653,530; 6,5412,59; 5,985,605; y 6,171,640), biopolímeros (Patentes de EE.UU. Nº USRE37,543; 6,228,623; Y 5,958,745, Y 6,946,588), resistencia a la tensión ambiental (Nº de patente de EE.UU.6,072,103), péptidos farmacéuticos y péptidos (secretablesPatentes de EE.UU. Nº 6,812,379; 6,774,283; 6,140,075; Y 6,080,560), rasgos de procesamiento mejorados (Nº de patente de EE.UU.6,476,295), mejora de la digestibilidad (Nº de patente de EE.UU.6,531,648) niveles bajos de rafinosa (Nº de patente de EE.UU.6,166,292), La producción de enzimas industriales (Nº de patente de EE.UU.5,543,576), mejora del sabor (Nº de patente de EE.UU.6,011,199), Fijación de nitrógeno (Nº de patente de EE.UU.5,229,114), producción de semillas híbridas (Nº de patente de EE.UU.5,689,041), producción de fibras (patentes de EE.UU. Nº 6,576,818; 6,271,443; 5,981,834; y 5,869,720) y producción de biocombustibles (Nº de patente de EE.UU.5,998,700).

Como alternativa, un gen de interés agrónomico puede afectar a la característica de la planta mencionada anteriormente o fenotipo mediante la codificación de una molécula de ARN que causa la modulación dirigida de la

expresión génica de un gen endógeno, por ejemplo a través de antisentido (ver, *por ejemplo*,, US Patent 5,107,065); ARN inhibidor ("ARNi", incluyendo la modulación de la expresión génica a través de mecanismos mediados por miARN, siARN-, siRNA de acción en trans y sARN en fase, *por ejemplo*, como se describe en las solicitudes publicadas US 2006/0200878, US 2008/0066206, Y US2009/0070898; o mecanismos mediados por cosupresión. El ARN también podría ser una molécula catalítica de ARN (por ejemplo, una ribozima o un riboswitch; véase por ejemplo, el documento US 2006/0200878) sometido a ingeniería genética para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. Por lo tanto, cualquier molécula de polinucleótido transcribible que codifica una molécula de ARN transcrita que afecta a un fenotipo agrónomicamente importante o un cambio de morfología de interés puede ser útil para la práctica de la presente invención. Se conocen procedimientos en la técnica para la construcción y la introducción de construcciones en una célula de tal manera que la molécula de polinucleótido transcribible se transcribe en una molécula que es capaz de causar la supresión génica. Por ejemplo, la supresión postranscripcional de genes utilizando una construcción con una molécula de polinucleótido transcribible antisentido orientada para regular la expresión de genes en células vegetales se describe en las patentes de EE.UU. N° 5,107,065 y 5,759,829, y la supresión postranscripcional de genes utilizando una construcción con una molécula de polinucleótido transcribible en sentido para regular la expresión génica en las plantas se describe en las patentes de EE.UU. N° 5,283,184 y 5,231,020. La expresión de un polinucleótido transcribible en una célula vegetal también se puede usar para suprimir plagas de plantas que se alimentan de la célula vegetal, por ejemplo, composiciones aisladas de plagas de coleópteros (patente de EE.UU. N° de publicación US2007/0124836) y composiciones aisladas de plagas de nematodos (patente de EE.UU. N° de publicación de patente US2007/0250947). Plagas de las plantas incluyen, pero no se limitan a las plagas de artrópodos, nematodos, hongos o microbianas y las plagas. Ejemplos de moléculas de polinucleótidos transcribibles para la incorporación en construcciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN o genes de una especie distinta de la especie objetivo o genes que se originan con o están presentes en las mismas especies, pero se incorporan en células receptoras mediante procedimientos de ingeniería genética en lugar de las técnicas de reproducción o de cultivo clásicas. El tipo de molécula de polinucleótido puede incluir, entre otras, una molécula de polinucleótido que ya está presente en la célula vegetal, una molécula de polinucleótido de otra planta, una molécula de polinucleótido de un organismo diferente, o una molécula de polinucleótido generada externamente, tales como una molécula de polinucleótido que contiene un mensaje antisentido de un gen, o una molécula de polinucleótido que codifica una versión artificial, sintética, o modificado de otro modo de un transgén.

### 30 Marcadores seleccionables

Como se usa en el presente documento, el término "marcador" se refiere a cualquier molécula de polinucleótido transcribible cuya expresión, o la falta del mismo, pueden someterse a las pruebas a favor o marcado de alguna manera. Los genes marcadores para uso en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a moléculas de polinucleótidos transcribibles que codifican la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS describe en N° de patente de EE.UU.5,599,670), Proteína fluorescente verde y variantes de los mismos (GFP se describe en N° de patente de EE.UU.5,491,084 y 6,146,826), Proteínas que confieren resistencia a los antibióticos, o proteínas que confieren tolerancia a los herbicidas. Marcadores de resistencia a antibióticos útiles, incluidas las proteínas que codifican que confieren resistencia a la kanamicina (*nptII*), Hígmomicina B (*APH IV*), Estreptomina o espectinomicina (*aad*, Espec / estreptomina) y gentamicina (*aac3y aacC4*) Son conocidos en la técnica. Herbicidas para el que la tolerancia planta transgénica se ha demostrado y el procedimiento de la presente invención se puede aplicar, incluyen, pero no se limitan a: metil-fosfónico amino ácido, glifosato, glufosinato, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinil, dalapon, dicamba, ciclohexanodiona, inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa y herbicidas isoxaflutol. Moléculas de polinucleótido transcribible que codifican proteínas implicadas en la tolerancia a los herbicidas son conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, una molécula de polinucleótido transcribible que codifica la sintasa de 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (EPSPS de tolerancia al glifosato se describe en N° de patente de EE.UU.5,627,061; 5,633,435; 6,040,497; Y 5,094,945); Una molécula de polinucleótido transcribible que codifica una glifosato oxidorreductasa y una transferasa glifosato-N-acetil (GOX describe en N° de patente de EE.UU.5,463,175; GAT describe en U.S. Patent publication No. 2003/0083480, Y dicamba monooxigenasa U.S. Patent publication No. 2003/0135879); Una molécula de polinucleótido que codifica bromoxinilo nitrilasa transcribible (*Bxn* para la tolerancia bromoxinil se describe en N° de patente de EE.UU.4,810,648); Una molécula de polinucleótido que codifica fitoeno desaturasa transcribible (*crtI*) Se describe en Misawa, et al., Plant Journal, 4:833-840 (1993) y Misawa, et al., Plant Journal, 6:481-489 (1994) Para la tolerancia a norflurazon; una molécula de polinucleótido transcribible que codifica la acetohidroxiácido sintasa (AHAS, también conocido como ALS) se describe en Sathasiivan, et al., Nucl. Acids Res., 18:2188-2193 (1990) Para la tolerancia a herbicidas de sulfonilurea, y el *bargen* se describe en DeBlock, y col., EMBO Journal, 6:2513-2519 (1987) Para glufosinato y bialaphos tolerancia. Las moléculas promotoras de la presente invención pueden expresar moléculas de polinucleótidos transcribibles ligado que codifican la fosfinotricina acetiltransferasa, la EPSPS resistentes a glifosato, aminoglicósido fosfotransferasa, piruvato deshidrogenasa hidroxifenil, fosfotransferasa de hígmomicina, neomicina fosfotransferasa, dalapon deshalogenasa, nitrilasa resistente a bromoxinil, antranilato sintasa, dioxigenasas aryloxyalkanoate, acetil CoA carboxilasa, glifosato oxidorreductasa, transferasa y glifosato-N-acetilo.

Incluidos dentro del término "marcadores seleccionables" son también genes que codifican un marcador secretable cuya secreción puede ser detectada como un medio de identificación o selección de células transformadas. Los ejemplos incluyen marcadores que codifican un antígeno secretable que puede ser identificado por la interacción de

anticuerpos, o incluso enzimas secretables que se pueden detectar catalíticamente. Proteínas marcadoras seleccionables secretadas se dividen en un número de clases, incluyendo proteínas difusibles pequeñas, que son detectables, (*por ejemplo*., Mediante ELISA), pequeñas enzimas activas, que son detectables en solución extracelular (*por ejemplo*., Alfa-amilasa, beta-lactamasa, fosfotricina transferasa), o proteínas que están insertadas o atrapadas en la pared celular (tales como proteínas que incluyen una secuencia líder tal como la que se encuentra en la unidad de expresión de extensión o del tabaco proteínas relacionadas con la patogénesis también conocido como el tabaco PR-S). Otros genes marcadores seleccionables posibles serán evidentes para los expertos en la técnica y están abarcadas por la presente invención.

Transformación celular

10 La invención también está dirigida a un procedimiento de producción de células y plantas transformadas que comprenden un promotor unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible.

El término "transformación" se refiere a la introducción de ácido nucleico en un huésped receptor. Como se usa en el presente documento, el término "huésped" se refiere a bacterias, hongos o plantas, incluyendo cualquier célula, tejido, órganos, o la progenie de las bacterias, hongos o plantas. Tejidos y células vegetales de interés particular incluyen protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, plantas, embriones, y el polen.

Como se usa en el presente documento, el término "transformado" se refiere a una célula, tejido, órgano u organismo en el que se ha introducido una molécula de polinucleótido extraña, tal como una construcción. La molécula de polinucleótido introducida puede integrarse en el ADN genómico de la célula receptora, tejido, órgano, u organismo tal que la molécula de polinucleótido introducida es heredada por la progenie. Un "transgénico" o célula "transformada" u organismo también incluye la progenie de la célula u organismo y la progenie producida a partir de un programa de cría empleando un organismo transgénico, como un padre en un cruce y que presenta un fenotipo alterado como resultado de la presencia de una molécula polinucleotídica extraña. El término "transgénico" se refiere a una bacteria, hongos, o planta que contiene una o más moléculas de ácido polinucleico heterólogas.

Hay muchos procedimientos para introducir moléculas de ácido polinucleicos en células de plantas. El procedimiento comprende generalmente las etapas de seleccionar una célula huésped adecuada, la transformación de la célula huésped con un vector recombinante, y la obtención de la célula huésped transformada. Los procedimientos adecuados incluyen infección bacteriana (*por ejemplo*, *Agrobacterium*), vectores de cromosomas artificiales bacterianos binarios, liberación directa de ADN (por ejemplo, a través de la transformación mediada por PEG, captación de AND mediada por desecación / inhibición, electroporación, agitación con fibras de carburo de silicio, y aceleración de partículas revestidas de ADN, etc. (revisado en Potrykus, et al., Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.,42:205 (1991)).

La tecnología para la introducción de una molécula de ADN en las células es bien conocida por los expertos en la técnica. Procedimientos y materiales para la transformación de células de plantas mediante la introducción de una construcción de ADN de la planta en un genoma de la planta en la práctica de la presente invención pueden incluir cualquiera de los procedimientos bien conocidos y demostrados, incluyendo, entre otros:

(1) procedimientos químicos (Graham y Van der Eb, Virology, 54:536-539 (1973) y Zadoukal, et al., Ann. NY Acad. Sci., 660:136-153 (1992));

(2) procedimientos físicos tales como microinyección (Capecchi, Cell, 22:479-488 (1980)), electroporación (Wong y Neumann, Biochim. Biophys. Res. . Comm, 107:584-587 (1982); Fromm, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82:5824-5828 (1985); patente de EE.UU. Nº 5,384,253), aceleración de partículas (Johnston y Tang, Methods Cell Biol., 43 (A) :353-365 (1994);Fynan, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11478-11482 (1993)); y bombardeo con microproyectiles (como se ilustra en las patentes de EE.UU. 5,015,580; 5,550,318; 5,538,880; 6,160,208; 6,399,861; y 6,403,865);

(3) vectores virales (Clapp, Clin. Perinatol., 20:155-168 (1993); Lu, et al., J. Exp. . Med., 178:2089-2096 (1993); Eglitis y Anderson, Biotechniques, 6:608-614 (1988));

(4) mecanismos mediados por receptores (Curiel et al., Hum. Gen. Ther., 3:147-154 (1992) y Wagner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6099-6103 (1992);

(5) mecanismos mediados por bacterias tal como la transformación mediada por *Agrobacterium* (como se ilustra en las patentes de EE.UU. Nº 5,824,877; 5,591,616; 5,981,840; y 6,384,301);

(6) introducción directa en el polen mediante la inyección de los órganos reproductores de las plantas (Zhou, et al., Methods in Enzymology, 101:433, (1983); Hess, Intern Rev. . Cytol, 107:367 (1987); Luo, et al., Plant Mol Biol. Reporter, 6:165 (1988); Pena, et al., Nature 325:274 (1987));

(7) transformación de protoplastos (como se ilustra en la patente de EE.UU. Nº 5,508,184); Y

(8) inyección en embriones inmaduros (Neuhaus et al., Theor. Appl. Genet., 75:30 (1987)).

5 Cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente puede usarse para transformar una célula huésped con uno o más promotores y / o construcciones de la presente. Las células huésped pueden ser cualquier célula u organismo, tal como una célula vegetal, célula de alga, algas, células de hongos, hongos, célula bacteriana, o célula de insecto. Los huéspedes preferidos y células transformadas incluyen células de: plantas, *Aspergillus*, levaduras, insectos, bacterias y algas.

10 Los procedimientos para la transformación de plantas dicotiledóneas, principalmente mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y la obtención de plantas transgénicas se han publicado para algodón (patentes de EE.UU. Nº 5,004,863; 5,159,135; y 5,518,908); soja (patentes de EE.UU. Nº 5,569,834 y 5,416,011; véase también, McCabe, et al., Biotechnology, 6:923 (1988) y Christou et al., Plant Physiol. 87:671-674 (1988)); *Brassica* (patente de EE.UU. Nº 5,463,174); cacahuete (Cheng et al., Plant Cell Rep., 15:653-657 (1996) y McKenty et al., Plant Cell Rep., 14:699-703 (1995)); papaya, y guisante (Grant et al., Plant Cell Rep., 15:254-258 (1995)).

15 También se han notificado transformaciones de plantas monocotiledóneas utilizando electroporación, bombardeo de partículas, y *Agrobacterium*. La transformación y la regeneración de las plantas se han logrado en espárragos (Bytebier, et al., Proc. Natl. Acas. Sci. U.S.A., 84:5354 (1987); cebada (Wan y Lemaux, Plant Physiol, 104:37 (1994)); maíz (Rhodes, et al., Science 240:204 (1988), Gordon-Kamm, et al., Plant Cell, 2:603-618 (1990), Fromm, et al., Bio / Technology, 8:833 (1990), Koziel et al., Bio / Technology, 11:194 (1993), Y Armstrong, et al., Crop Science, 35:550-557 (1995)); avena (Somers, et al., Bio / Technology, 10:1589 (1992)); grama de huerto (Horn, et al., Plant Cell Rep., 7:469 (1988)); centeno (De la Peña, et al., Nature, 325:274 (1987)); caña de azúcar (Bower y Birch, Plant Journal, 2:409 (1992)); *Festuca alta* (Wang, et al., Bio / Technology, 10:691 (1992)), y trigo (Vasil, et al., Bio / Technology, 10:667 (1992) y patente de EE.UU. Nº. 5,631,152).

25 La regeneración, el desarrollo, y el cultivo de plantas a partir de protoplastos o explantes de planta transformada es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, (Eds.), Academic Press, Inc., San Diego, CA (1988) y Horsch et al., Science, 227:1229-1231 (1985)). Las células transformadas generalmente se cultivan en presencia de un medio selectivo, que selecciona las células transformadas con éxito e induce la regeneración de brotes de las plantas y raíces en plantas intactas (Fraleley, et al., Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU., 80: 4803 (1983)). Las plantas transformadas se obtienen típicamente en un plazo de dos a cuatro meses.

30 Las plantas transgénicas regeneradas se autopolinizan para proporcionar plantas transgénicas homocigóticas. Como alternativa, el polen obtenido de las plantas transgénicas regeneradas puede cruzarse con plantas no transgénicas, líneas preferentemente endogámicas de especies agrónomicamente importantes. Descripciones de los procedimientos de cultivo que se utilizan habitualmente diferentes rasgos y cultivos se pueden encontrar en uno de los diversos textos de referencia, véase, por ejemplo, Allard, Principles of Plant Breeding, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98 (1960); Simmonds, Principles of crop improvement, Longman, Inc., NY, 369-399 (1979); Sneeep and Hendriksen, Plant breeding perspectives, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, Soybeans: Improvement, Production and Uses, 2nd Edition, Monograph., 16: 249 (1987); Fehr, Principle of variety development, Theory and Technique, (Vol 1) and Crop Species Soybean (Vol 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987). Por el contrario, el polen de plantas no transgénicas puede usarse para polinizar las plantas transgénicas regeneradas.

45 Las plantas transformadas pueden analizarse para determinar la presencia de los genes de interés y el nivel de expresión y / o su perfil conferido por los elementos reguladores de la presente invención. Los expertos en la técnica conocen los numerosos procedimientos disponibles para el análisis de plantas transformadas. Por ejemplo, procedimientos para el análisis de plantas incluyen, pero no se limitan a, transferencias de tipo Southern o transferencias de tipo Northern, abordajes basados en PCR, análisis bioquímicos, procedimientos de selección fenotípica, evaluaciones de campo, y ensayos de inmunodiagnóstico. La expresión de una molécula de polinucleótido transcribible se puede medir usando TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) reactivos y procedimientos como describe el fabricante y los tiempos de ciclo de PCR se determinan utilizando TaqMan® Testing Matrix. Como alternativa, se pueden usar los reactivos y procedimientos Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) como describe el fabricante para la expresión del transgen.

50 Las semillas de las plantas de la presente invención se pueden cosechar a partir de plantas transgénicas fértiles y usarse para cultivar generaciones de progenie de plantas transformadas de la presente invención que incluyen líneas de plantas híbridas que comprenden la construcción de la presente invención y que expresan un gen de interés agronómico

55 La presente invención también proporciona partes de las plantas de la presente invención. Partes de la planta, sin limitación, incluyen hojas, tallos, raíces, tubérculos, semillas, endosperma, óvulos y polen. La invención también incluye y proporciona células vegetales transformadas que comprenden una molécula de ácido nucleico de la presente invención.

La planta transgénica puede pasar a lo largo de la molécula de polinucleótido transgénico a su progenie. Laa progenie incluye cualquier parte de la planta regenerable o semilla que comprende el transgén derivado de una planta aneuploide. La planta transgénica es, preferentemente, homocigótica para la molécula de polinucleótido transformada y transmite esa secuencia a toda la descendencia como resultado de la reproducción sexual. La progenie puede cultivarse a partir de semillas producidas por la planta transgénica. Después, estas plantas adicionales pueden autopolinizarse para generar una verdadera línea de reproducción de las plantas. La progenie de estas plantas se evalúa, entre otras cosas, para determinar la expresión génica. La expresión génica puede detectarse por varios procedimientos comunes, tales como transferencia de tipo Western, transferencia de tipo Northern, inmunoprecipitación, y ELISA.

Habiendo descrito ahora en general la invención, la misma se entenderá más fácilmente a través de referencia a los siguientes ejemplos. Los ejemplos que no entran dentro del ámbito de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

**Ejemplos**

Se aislaron los elementos reguladores útiles para dirigir la expresión de un polinucleótido transcribible unido operativamente en plantas transgénicas y el patrón de expresión de estos elementos reguladores unidos de manera operable a una molécula de polinucleótido transcribible se analizó en plantas de maíz transgénicas.

**Ejemplo 1: Identificación y clonación de elementos reguladores**

Nuevos elementos reguladores se identificaron y se aislaron a partir de ADN genómico de las especies de monocotiledóneas, mijo menor (*Setaria italica*(L.) Beauv). La secuencia EST se usó para diseñar cebadores, que luego se utilizaron con GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) de bibliotecas construidas siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 5' de la correspondiente secuencia de ADN genómico. Esta región clonada contenía la secuencia 5' UTR cadena arriba de la región codificante de la proteína para cada gen a partir *S. italica*. Usando esta secuencia, los elementos reguladores se identificaron bioinformáticamente dentro de la 5' UTR de cada gen. Se utilizó el análisis bioinformático para identificar el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y cualquier bidireccionalidad, intrones, o la secuencia de codificación cadena arriba presente en la secuencia. Utilizando los resultados de este análisis, los elementos reguladores se definen dentro de la secuencia 5' UTR. Los cebadores se diseñaron para amplificar los elementos reguladores. La molécula de ADN correspondiente para cada elemento regulador se amplificó usando condiciones de reacción en cadena de polimerasa estándar con cebadores que contienen sitios de enzimas de restricción únicos y ADN genómico aislado a partir *S. italica*. Los fragmentos de ADN resultantes se ligaron en un vector de expresión vegetal base utilizando digestión con enzimas de restricción estándar de los sitios de restricción compatibles y procedimientos de ligación de ADN. Los vectores de expresión de plantas resultantes contenían una región fronteriza de *Agrobacterium tumefaciens*(B AGRtu.right), elementos reguladores de ensayo unido operativamente a un intrón derivado de la proteína HSP70 de choque térmico de *Zea mays*, unida operativamente a una secuencia codificante para la β-glucuronidasa (GUS), unido operativamente a la región de terminación en 3' de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*, y una región de la frontera izquierda desde *A. tumefaciens* (B-AGRtu.left).

Las secuencias de los elementos reguladores se proporcionan en el presente documento como SEC ID N° 1-20 y se enumeran en la Tabla 1 a continuación. Las secuencias promotoras se proporcionan en el presente documento como SEC ID N° 2, 5, 8, 10, 13, y 20. Las secuencias líder se proporcionan en el presente documento como SEC ID N° 3, 6, 11, y 16. Las secuencias proporcionadas en el presente documento como SEC ID N° 1, 4, 7, 9, 12, 14, 17, y 19 son un promotor unido operativamente y la secuencia líder.

**Tabla 1: elementos reguladores.**

SEC ID	Anotación	Anotación de ADNc
1	EXP-SETit.TIP	Proteína intrínseca de tonoplastos
2	P-SETit.Tip-1:1:1	Proteína intrínseca de tonoplastos
3	L-SETit.Tip-1: 1:1	Proteína intrínseca de tonoplastos
4	EXP-SETit.Mtha	Proteína similar a la metalotioneína
5	P-SETit.Mtha-1: 1:1	Proteína similar a la metalotioneína
6	L-SETit.Mes-l: 1:1	Proteína similar a la metalotioneína

SEC ID	Anotación	Anotación de ADNc
7	EXP-SETit.MThB	Proteína similar a la metalotioneína
8	P-SETit.MThB-1: 1:2	Proteína similar a la metalotioneína
9	EXP-SETit.DRPA	Proteína a relacionada con la deshidratación
10	P-SETit.DRPA-1: 1:1	Proteína a relacionada con la deshidratación
11	L-SETit.DRP-1: 01:2	Proteína a/b relacionada con la deshidratación
12	EXP-SETit.DRPb	Proteína b relacionada con la deshidratación
13	P-SETit.DRPb-1: 1:1	Proteína b relacionada con la deshidratación
14	EXP-SETit.RCC3-1	Proteína de transferencia de lípidos
15	P-SETit.RCC3-1: 1:1	Proteína de transferencia de lípidos
16	L-SLTit.RCC3-1: 1:2	Proteína de transferencia de lípidos
17	EXP-SETit.RCC3-10	Proteína de transferencia de lípidos
18	P-SETit.RCC3-1: 1:10	Proteína de transferencia de lípidos
19	EXP-SETit.RCC3-11	Proteína de transferencia de lípidos
20	P-SPTit.RCC3-1: 1:11	Proteína de transferencia de lípidos

El elemento de expresión, EXP-SETit.TIP (SEC ID N° 1) se compone del promotor P-SETit.Tip-1: 1:1 (SEC ID N° 2) y la secuencia líder L-SETit.Tip-1: 1:1 (SEC ID N° 3).

5 Para los elementos reguladores del gen de la proteína de transferencia de lípidos se diseñaron tres variantes promotoras (Figura 1). P-SETit.RCC3-1: 01:1 una versión de 2062 nucleótidos (SEC ID N° 15), P-SETit.RCC3-1: 1:10 una versión de 1563 nucleótidos (SEC ID N° 18); y P-SETit.RCC3-1: 01:11 una versión de 915 nucleótidos (SEC ID N° 20). El elemento de expresión, EXP-SETit.RCC3-1 (SEC ID N° 14) se compone del promotor P-SETit.RCC3-1:1:1 (SEC ID N° 15) y la secuencia líder P-SETit.RCC3-1: 1:2 (SEC ID N° 16). El elemento de expresión, EXP-SETit.RCC3-10 (SEC ID N° 17) se compone del promotor P-SETit.RCC3-1: 1:10 (SEC ID N° 18) y la secuencia líder L-SETit.RCC3-1: 1:2 (SEC ID N° 16). El elemento de expresión, EXP-SETit.RCC3-11 (SEC ID N° 19) se compone del promotor P-SETit.RCC3-1: 01:11 (SEC ID N° 20) y la secuencia líder P-SETit.RCC3-1: 1:02 (SEC ID N° 16).

15 Para los elementos reguladores del gen de la proteína similar a metalotioneína se diseñaron dos variantes del promotor (Figura 2). P-SETit.Mtha-1: 01:1 es una versión 483 nucleótidos más corta, P-SETit.MThB-1: 01:2 es una versión 1516 nucleótidos más larga de este. El elemento de expresión, EXP-SETit.Mtha (SEC ID N° 4) se compone del promotor P-SETit.Mtha-1:1:1 (SEC ID N° 5) y la secuencia líder L-SETit.Mes-1: 1:1 (SEC ID N° 6). El elemento de expresión, EXP-SETit.MThB (SEC ID N° 7) se compone del promotor P-SETit.MThB-1: 1:2 (SEC ID N° 8) y la secuencia líder L-SETit.Mes-1: Líder 1:1 (SEC ID N° 5).

20 Para los elementos reguladores del gen de la proteína relacionada con la deshidratación, se aislaron los elementos reguladores de dos variantes alélicas (Figuras 3A y 3B). Las dos variantes alélicas tienen secuencias líder idénticas, pero las secuencias del promotor son variantes con varios cambios de bases e inserciones/delecciones cuando están alineadas. El elemento de expresión, EXP-SETit.DRPA (SEC ID N° 9) se compone del promotor P-SETit.DRP-1:1:1 (SEC ID N° 10) y la secuencia líder L-SETit.DRP-1: 1:2 (SEC ID N° 11). El elemento de expresión, EXP-SETit.DRPb (SEC ID N° 12) se compone del promotor P-SETit.DRPb-1:1:1 (SEC ID N° 13) y la secuencia líder L-SETit.DRP-1: 1:2 (SEC ID N° 11).

25 **Ejemplo 2: Análisis de elementos reguladores q1 dirigen la expresión de GUS en maíz transgénico**

Las plantas de maíz se transformaron con vectores de expresión de plantas que contienen los elementos reguladores de ensayo que dirigen la expresión del transgén de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y se analizaron las plantas resultantes para determinar la expresión de la proteína GUS.

5 Las plantas de maíz se transformaron con construcciones de expresión de GUS de plantas, pMON101552 (EXP-SETit.TIP, SEC ID N° 1), pMON99662 (EXP-SETit.Mtha, SEC ID N° 4), y pMON99663 (EXP-SETit.DRPA, SEC ID N° 9). Las plantas se transformaron utilizando procedimientos de bombardeo de partículas conocidos por los expertos en la técnica y embriones cigóticos inmaduros de maíz H99 para producir plantas de maíz transgénicas. En pocas palabras, las mazorcas de las plantas H99 de maíz se recogieron 10 a 13 días después de la polinización de las plantas cultivadas en invernadero y se esterilizaron. Los embriones cigóticos inmaduros de 1,2 a 1,5 mm se extirparon de la mazorca y se incubaron a 28 ° C en la oscuridad durante 3-5 días antes de su uso como tejido diana para el bombardeo. El vector de transformación de la planta que contiene el marcador seleccionable para la resistencia a la kanamicina (gen NPTII) y el casete de expresión de GUS se dirigió con endonucleasas de restricción. Un único fragmento de ADN que contiene tanto el marcador seleccionable y el casete de expresión de GUS se purificó en gel y se utilizó para recubrir partículas de oro de 0,6 micrómetros (n° de catálogo 165-2262 Bio-Rad, Hercules, CA) para el bombardeo. Se cargaron macro-vehículos con las partículas de oro recubiertas de ADN (n° de catálogo 165-2335 Bio-Rad, Hercules CA). Los embriones se transfirieron a medio osmótico, el lado del escutelo mirando hacia arriba. Una pistola biolística PDS 1000/He se utilizó para la transformación (n° de catálogo 165 - 2257 de Bio-Rad, Hercules CA). Embriones inmaduros bombardeadas se cultivaron y se seleccionaron los callos transgénicos y se transfirieron a medio de regeneración tisular. Las plantas de maíz transgénicas se regeneraron a partir de los callos transgénicos y se transfirieron al invernadero.

25 Se utilizó el análisis histoquímico de GUS para el análisis de la expresión cualitativa de plantas transformadas. Secciones enteras de tejido se incubaron con solución de tinción de GUS X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -glucuronido) (1 miligramo / mililitro) para un periodo de tiempo apropiado, se aclararon y se inspeccionaron visualmente para detectar una coloración azul. La actividad de GUS se determinó cualitativamente mediante inspección visual directa o inspección bajo un microscopio usando órganos y tejidos vegetales seleccionados. En las plantas R<sub>0</sub> se inspeccionó la expresión en las raíces y las hojas. Se demostró expresión de GUS de los elementos reguladores EXP-SETit.TIP (SEC ID N° 1), EXP-SETit.Mtha (SEC ID N° 4), y EXP-SETit.DRPA (SEC ID N° 9) tanto en las raíces como en las hojas en los transformantes R<sub>0</sub>.

30 Las plantas transformadas con la expresión de GUS dirigida por EXP-SETit.TIP (SEC ID N° 1) o EXP-SETit.Mtha (SEC ID N° 4) se cruzaron con plantas H99 no transformadas para producir una población F<sub>1</sub> de transformantes. Los niveles de expresión de GUS se midieron en tejidos seleccionados en el transcurso del desarrollo. Los tejidos F<sub>1</sub> usados para este estudio incluyeron: embrión de la semilla embebida, endosperma de semilla embebida, raíz (3 días después de la germinación), coleótilos (3 días después de la terminación), raíz principal y corona en V3, hoja en V3, raíz seminal y corona en V7, hoja madura en V7, raíz seminal en VY (en floración, con anterioridad a la reproducción), entrenudo en VT, mazorca VT, antera VT, polen VT, seda VT, grano 7 días después de la polinización, embrión de 21 días después de la polinización, endospermo 21 días después de la polinización, embrión de 35 días después polinización, endosperma 35 días después de la polinización. La expresión de GUS en F<sub>1</sub> se observó en todos los tejidos estudiados tanto para los eventos transformados de EXP-SETit.TIP (SEC ID N° 1) como para EXP-SETit.Mtha (SEC ID N° 4).

#### 40 **Ejemplo 3: Análisis de los elementos reguladores que dirigen TIC809 de maíz transgénico**

Las plantas de maíz se transformaron con vectores de expresión de plantas que contienen los elementos reguladores que dirigen la expresión del transgén TIC809 y se analizaron las plantas resultantes para determinar la expresión de la proteína TIC809.

45 Los elementos reguladores se unieron operativamente al transgén de la toxina de insecto, TIC809 (PCTUS2006/033867) en vectores de transformación de plantas. El casete del transgén estaba compuesto por el o los elemento (s) regulador(es) ligados operablemente a un intrón derivado de la proteína HSP70 de choque térmico de *Zea mays*, unida operativamente al transgén TIC809, unido operativamente a una región 3' UTR derivada del gen HSP17 de *Triticum aestivum*. Los vectores de transformación de plantas también contenían un marcador seleccionable de tolerancia al glifosato para la selección de células vegetales transformadas.

50 Tejido de maíz de la variedad LH244 se transformó utilizando transformación mediada por *A. tumefaciens* con los plásmidos, pMON70539 (EXP-SETit.TIP, SEC ID N° 1), pMON70540 (EXP-SETit.Mtha, SEC ID N° 4), y pMON70538 (EXP-SETit.DRPA, SEC ID N° 9) usando procedimientos conocidos en la técnica. Las plantas R<sub>0</sub> se regeneraron a partir del tejido de maíz transformado y se analizaron para confirmar la presencia y la integridad del transgén TIC809. 55 Las hojas y las raíces de estas plantas se analizaron en las etapa V4 o V6 o mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) de TIC809 para determinar los niveles de acumulación de la proteína TIC809. Los valores de la proteína se determinaron utilizando una muestra de referencia TIC809 y se expresaron en unidades de partes por millón (ppm). Los datos de ELISA se presentan en la Tabla 2, en la que "N" indica el número de plantas examinadas.

**Tabla 2: Datos de ELISA de TIC809.**

Nombre del elemento	SEC ID N°	Vector	Raíz (ppm)	Hoja (ppm)	N
EXP-SETit.TIP	1	pMON70539	3	6	26
EXP-SETit.Mtha	4	pMON70540	3	8	20
EXP-SETit.DRPa	9	pMON70538	1	2	24

5 La expresión de TIC809 dirigida por los elementos de expresión, EXP-SETit.TIP (SEC ID N° 1), EXP-SETit.Mtha (SEC ID N° 4), y EXP-SETit.DRPA (SEC ID N° 9) se observó tanto en las raíces como en las hojas, lo que demuestra la capacidad de los elementos reguladores EXP-SETit.TIP, EXP-SETit.Mtha y EXP-SETit.DRPA para modular la transcripción de un transgén unido operativamente de interés agronómico en plantas. La expresión promedio de TIC809 dirigida por EXP-SETit.TIP (SEC ID N° 1), EXP-SETit.Mtha (SEC ID N° 4), y EXP-SETit.DRPA (SEC ID N° 9) se multiplicó por al menos 2 o más en la hoja con respecto a la raíz para las tres construcciones.

10 Plantas R0 transformadas que contienen los vectores (pMON70539 EXP-SETit.TIP, SEC ID N° 1), pMON70540 (EXP-SETit.Mtha, SEC ID N° 4), y pMON70538 (EXP-SETit.DRPA, SEC ID N° 9) se cruzaron con la variedad LH59, utilizando LH59 como la planta femenina y LH244 transformado como la masculina, para producir poblaciones F<sub>1</sub> transformadas. Para las plantas que contienen EXP-SETit.TIP (SEC ID N° 1) y EXP-SETit.Mtha (SEC ID N° 4), los niveles de proteína TIC809 se midieron utilizando ELISA en las hojas de F<sub>1</sub> en las etapas V3, V7, y VT; en las raíces en las etapas V3 y V7; en los tejidos reproductivos alrededor etapa VT (antera, polen y seda), y en la semilla en desarrollo o el grano. Los resultados de ELISA se expresan en partes por millón (ppm) y las mediciones del error estándar se indican como "SE" y presentan en la Tabla 3 a continuación. Para las plantas que contienen EXP-SETit.DRPA (SEC ID N° 9), se midieron los niveles de proteína TIC809 en las raíces mediante ELISA con tejido tomado en la etapa V9. Los resultados dekl ELISA se expresan en partes por millón (ppm) y se presentan en la Tabla 4 a continuación.

**Table 3: Datos de ELISA e TIC809 F<sub>1</sub> para EXP-SETit.TIP y EXP-SETit.Mtha.**

Tejido	EXP-SETit.TIP		EXP-SETit.Mtha	
	ppm	SE	ppm	SE
Hoja V3	1,138	0,32	1,312	0,46
Raíz V3	1,254	0,41	1,242	0,39
Tallo V3	0,694	0,14	0,407	0,19
Hoja V7	0,879	0,3	1,295	0,31
Raíz V7	0,755	0,35	1,185	0,46
Hoja VT	0,308	0,17	0,457	0,35
Antera	0,323	0,06	0,364	0,1
Seda	0,249	0,1	0,222	0,05
Polen	0,315	0,16	0,231	0,01
Semilla	0,138	0,02	0	0

20 Los niveles de expresión promedio de la proteína TIC809 por los elementos reguladores, EXP-SETit.TIP (SEC ID N° 1) y EXP-SETit.Mtha (SEC ID N° 4) en las poblaciones F<sub>1</sub> fueron consistentes con los niveles de expresión observados en los transformantes R0, lo que confirma la capacidad los elementos reguladores TIP y Mtha para

5 dirigir la expresión de un transgen operativamente unido. EXP-SETit.TIP (SEC ID N° 1) parece tener su nivel de expresión más alto en V3 en las raíces y las hojas, disminuyendo la expresión en la etapa V7, y bajos en los tejidos reproductivos y en la semilla en desarrollo. EXP-SETit.Mtha (SEC ID N° 4) muestra una expresión consistente de TIC809 en las raíces y las hojas en las etapas V3 a V7, con una disminución en la expresión en la etapa de hoja VT, menor expresión en el tejido reproductivo y ninguna expresión en la semilla en desarrollo.

**Tabla 4: Datos de ELISA de TIC809 F1 ELISA para EXP-SETit.DRPa.**

Tejido de F <sub>1</sub> cruzada	ppm
LH59/ZM_S198227	0.95
LH59/ZM_S198230	2.69
LH59/ZM_S198235	0.5
LH59/ZM_S199429	1.26
LH59/ZM_S201032	1.09
LH59/ZM_S201049	0.64
<b>Expresión promedio de TIC809</b>	<b>1.19</b>
Error estándar	0.79

10 Los niveles de expresión promedio de la proteína TIC809 dirigida por el elemento regulador, EXP-SETit.DRPA (SEC ID N° 9) en las raíces de la población F1 fueron consistentes con los niveles de expresión observados en los transformantes R<sub>0</sub>, lo que confirma la capacidad de los elementos reguladores DRPA para proporcionar expresión en la raíz de un transgen unido operativamente.

15 Se produjeron poblaciones R<sub>0</sub> de plantas transformadas con pMON120408 (EXP-SETit.Rcc3-1, SEC ID N° 14), pMON120407 (EXP-SETit.RCC3-1.0, SEC ID N° 17), y pMON120410 (EXP-SETit.Rcc3-11, SEC ID N° 19) como se ha descrito anteriormente. Los niveles de la proteína TIC809 en estas plantas se midieron en hojas y raíces utilizando ELISA con tejido extraído en la etapa V4 o V6. Los resultados del ELISA se expresan en partes por millón (ppm) y se presentan en la Tabla 5 a continuación.

**Tabla 5: Datos de ELISA de TIC809 R<sub>0</sub> para EXP-SETit.RCC3-1, EXP-SETit.RCC3-10 y EXP-SETit.RCC3-11.**

Nombre del elemento	Suceso	Raíz (ppm)	Hoja (ppm)
EXP-SETit.Rcc3-1 (SEC ID N° 14)	1	0,292	0
EXP-SETit.Rcc3-1 (SEC ID N° 14)	2	2,79	0
EXP-SETit.Rcc3-1 (SEC ID N° 14)	3	1,171	0
<b>EXP-SETit.Rcc3-1 (SEC ID N° 14)</b>	<b>Promedio</b>	<b>1,42</b>	<b>0</b>
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	1	2,129	0
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	2	1,793	0
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	3	0,425	0
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	4	0,677	0

ES 2 457 218 T3

Nombre del elemento	Suceso	Raíz (ppm)	Hoja (ppm)
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	5	0,877	0
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	6	1,847	0
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	7	1,479	0
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	8	0,359	0
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	9	1,84	0
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	10	3,309	0
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	11	1,589	0
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	12	3,652	0,294
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	13	1,019	0
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	14	2,715	0,56
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	15	0,981	0
EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)	16	3,147	0,317
<b>EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17)</b>	<b>Promedio</b>	<b>1,74</b>	<b>0,07</b>
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	1	2,356	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	2	2,343	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	3	1,465	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	4	2,271	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	5	0,247	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	6	2,949	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	7	3,36	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	8	4,771	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	9	1,757	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	10	2,255	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	11	3,314	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	12	4,958	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	13	0,232	0

Nombre del elemento	Suceso	Raíz (ppm)	Hoja (ppm)
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	14	1,503	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	15	1,425	0
EXP-SETit.Rcc3.11 (SEC ID N° 19)	16	3,6	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	17	3,533	0
EXP-SETitRcc3-11 (SEC ID N° 19)	18	2,158	0
<b>EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)</b>	<b>Promedio</b>	<b>2,47</b>	<b>0</b>

5 La expresión de TIC809 cuando está dirigida por variants de los elementos de expresión EXP-SETit.RCC3-1 (SEC ID N° 14), EXP-SETit.RCC3-10 (SEC ID N° 17), y EXP-SETit.RCC3-11 (SEC ID N° 19) era fuerte en las raíces y débil o ausente en las hojas. Se observó una expresión baja o nula en las hojas para las tres variantes SETit.Rcc3 con la excepción de tres sucesos transformados en los que la variante del elemento de expresión, EXP-SETit.RCC3-10 (SEC ID N° 17) mostró un bajo nivel de expresión TIC809 en las hojas. La expresión promedio en la raíz de la proteína TIC809 fue mayor utilizando la variante del elemento de expresión, EXP-SETit.RCC3-11 (SEC ID N° 19) con respecto a las variantes EXP-SETit.RCC3-1 (SEC ID N° 14) y EXP-SETit.RCC3-10 (SEC ID N° 1, pero todas las tres variantes proporcionaron expresión en la raíz del transgen operativamente unido.

10 <110> Dietrich, Charles R Flasiniski, Stanislaw

<120> ELEMENTOS REGULADORES DE PLANTAS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> MONS:222WO (38 - 21(54107)0000 WO)

15

<140>desconocido

<141> 2009 - 03 - 30

<150> US 61/042957

20

<151> 2008 - 04 - 07

<160> 20

<210> 1

25

<211> 981

<212> ADN

<213> Setaria italica

<400> 1

30

# ES 2 457 218 T3

```

tgtactgtca tattgtcgtg gtttttcaat tgctgtacct gatgcaaacg taatggggtt 60
actaatcttg cacccgcggg cttcaaaatg aagagtgcga atttggcca cgtcaccatc 120
accggttcga actgtctaga atggcaggca aagatgattg gacaggcatg cagggaaaaa 180
gagcaccggt gacgatgat gcgagttccc accattgcga gcaatgatta tcagccacac 240
gacttactct tcagagctaa ccactgccat gcagagaaaa agtgaatcat attgtcatga 300
tctacaacga agtgaacaa tcaggcatgc taaagtgcgt aaactttact gatctctcat 360
gttggaacaac aaagaatacg ggaatacatc agcaacgcaa ctcttgagct ttgcttgccg 420
aatgaccagc tagaatttcc aagcatttac agaaacatga ctttaagttt cagaaaaaca 480
aatacaaggc cactaaataa gcgtggggat aacatatacct ccagatgaca ggcaatctgc 540
aacttgcagc cattcaaatg tacgattaac aaaatattta agcgccacat gagataatat 600
atcctccaat tagggccttt agtattgtca ttagctcata accatggtgc atcctcacat 660
ggacgctgca taagaagttc ataatagcaa cagacatatg aacaaagcat ggtgcgcctg 720
ccgggccgga ctagctagta ctaccaatca tggaataagc tagtacccta aatgaaatta 780
aaatggtttt tagcgattat ccacgcgctc cagaatactc taatccacaa gttgaggccg 840
cccatgaagc cgcgagaggg cgacgccatg tgtataaaag gggcctaagc tgagtggact 900
tgctgcatca gattagtaag caatctcaag cgcagagagc caaagctttc ggtgtagctc 960
gaagagcaaa gcgaaggcaa g 981

```

<210> 2

<211> 917

5 <212> ADN

<213> *Setaria italica*

<400> 2

ES 2 457 218 T3

tgtactgtca tattgtcgtg gtttttcaat tgctgtacct gatgcaaacg taatggggtt 60  
 actaatcttg caccgcgagg cttcaaaatg aagagtgcta atttggcca cgtcaccatc 120  
 accggttcga actgtctaga atggcaggca aagatgattg gacaggcatg cagggaaaaa 180  
 gagcaccgtt gacgatgtat gcgagttccc accattgcca gcaatgatta tcagccacac 240  
 gacttactct tcagagctaa ccaactgccat gcagagaaaa agtgaatcat attgtcatga 300  
 tctacaacga agtgaacaaa tcaggcatgc taaagtgtg aaactttact gatctctcat 360  
 gttggacaac aaagaatacg ggaatacatc agcaacgcaa ctcttgagct ttgcttgccg 420  
 aatgaccagc tagaatttcc aagcatttac agaaacatga ctttaagttt cagaaaaaca 480  
 aatacaaggc cactaaataa gcgtagggat aacatatcct ccagatgaca ggcaatctgc 540  
 aactgcagc cattcaaatg tacgattaac aaaatattta agcgccacat gagataatat 600  
 atcctccaat tagggccttt agtattgtca ttagctcata accatggtgc atcctcacat 660  
 ggacgctgca taagaagttc ataatagcaa cagacatatg aacaaagcat ggtgagcctg 720  
 cccggccgga ctagctagta ctaccaatca tggaataagc tagtacccta aatgaaatta 780  
 aatgggttt tagcgattat ccacgccgtc cagaatactc taatccacaa gttgaggccg 840  
 cccatgaagc cgcgagaggg cgcgccatg tgtataaaag gggcctaagc tgagtggact 900  
 tgctgcatca gattagt 917

<210> 3

<211> 64

5 <212> ADN

<213> *Setaria italica*

<400> 3

aagcaatctc aagcgcagag agccaaagct ttcggtgtag ctggaagagc aaagcgaagg 60  
 10 caag 64

<210> 4

<211> 550

<212> ADN

15 <213> *Setaria italica*

<400> 4

ES 2 457 218 T3

taaggaaata ataaaagaag aaactacttg tttttgcaat gataacgtac atacagatat 60  
 ttctaaagcc atcaagtacc tagcttgtct aaataacaag tgtgtcctgg aacaagtatc 120  
 gagtacctga aagcaacctg ctttgaattg gaaaggataa aaattcgaca aggaacgaac 180  
 aaaggaggca ctttcttgc cggccagaaa ctattgggtc tttgcatcct tgtgaattga 240  
 taaacgtgct ggtgtgtttc aatgatgtcc atgagatggg aatacaaagt caagcacgcc 300  
 ttattacctt attgtgtggc tctgtctgca gaaagcaacc gggcgattt tcttccgata 360  
 ccgtggttac tttcaaattg gaagacagag acgtacacac aaggcaataa ttcagggaac 420  
 aattccatcc atccactgct ataaaaggcg gtggtggggg gttgggtctc ttcagttcag 480  
 tgtgctcaag caatctcaaa gaacttgtct tctccatcca caccgagttt ttcggettct 540  
 tgacttgaag 550

<210> 5

5 <211> 483

<212> ADN

<213> *Setaria italica*

<400> 5

taaggaaata ataaaagaag aaactacttg tttttgcaat gataacgtac atacagatat 60  
 ttctaaagcc atcaagtacc tagcttgtct aaataacaag tgtgtcctgg aacaagtatc 120  
 gagtacctga aagcaacctg ctttgaattg gaaaggataa aaattcgaca aggaacgaac 180  
 aaaggaggca ctttcttgc cggccagaaa ctattgggtc tttgcatcct tgtgaattga 240  
 taaacgtgct ggtgtgtttc aatgatgtcc atgagatggg aatacaaagt caagcacgcc 300  
 ttattacctt attgtgtggc tctgtctgca gaaagcaacc gggcgattt tcttccgata 360  
 ccgtggttac tttcaaattg gaagacagag acgtacacac aaggcaataa ttcagggaac 420  
 aattccatcc atccactgct ataaaaggcg gtggtggggg gttgggtctc ttcagttcag 480  
 10 tgt 483

<210> 6

<211> 67

<212> ADN

<213> *Setaria italica*

15

<400> 6

gctcaagcaa tctcaaagaa cttgtcttct ccatccacac cgagtttttc ggettcttga 60  
 cttgaag 67

ES 2 457 218 T3

<210> 7

<211> 1583

<212> ADN

<213> *Setaria italica*

5

<400> 7

```

cctcttctt tatttttgcc atcagcgtcg ttggtgaact ctctgacctg ttaaagatgt   60
gtgtgttccg ctctttccaa atttcccata taatgagtag agtgagactt tgcatagcct  120
tgcgcggtaa gtccagtatt gtagttatag aagtccatca ttccaatgca ttggatgagg  180
gttgccatgc agttggtctg atgcttggtc gcgctaacca tgttgccgtt aaatcccata  240
tctccttgt gttcctgcac tttagcctaga tgtggtgact agtttccatg gtttgtctgc  300
atagggtgca agtggcgttg tatggccatc cacgtttage ctgcctatcc acggaccaa  360
ctcagttttg tgtaattagc cgcaagaaga atttgcattt tgccggcgcc cacgttttcc  420
agacagaaga gatttctggt gtttcgatgc agcccaggaa ctgtgcttta tatgccgatg  480
ctattgtata catgacggat cttgttagtt tctagaagat agtatcctct tccacttatc  540
gaagctcctg accatagccc atagggcgaa cgatgctaga tgctaaatgt gaagtggatga  600
tgctgttgtc gatattgagg tcacagatcc agttgttact gatagcatcg tgaactgtcc  660
tattttgtct tcttgaaatg tcgaagagga gtggagcaat gtccttaggt gctggccatg  720
tagctagcca gaagtccaga agctagcctt tttgccatca ccaagagtga taacatgca  780
ggcaacaaat acttgcatgt ctgtctcgtc gcatgggatt tctatggttg tccagggttt  840
ttccggtgat gctactcat gccaaagcca cctcagacgg agggctcgtg cgaatttctc  900
gaggtcagcc cctcgtattg cttcagtagg caggttttcg tccagttgac tttacattta  960
ccctcggtta gctgttggtc tcccgtcag aggaattttt tacggatctt gtctaagtct 1020
tgtagccctt ctttaaggaa ataataaag aagaaactac ttgtttttgc aatgataacg 1080
tacatacaga tattttctaaa gccatcaagt acctagcttg tctaaataac aagtgtgtcc 1140
tggaacaagt atcgagtacc tgaaagcaac ctgctttgaa ttggaaagga taaaaattcg 1200
acaaggaacg acaaaaggag gcacatttct tgccggccag aactatttgg gtctttgcat 1260
ccttgatgat tgataaacgt gctgggtgtg ttcaatgatg tccatgagat ggaatacaa 1320
agtcaagcac gccttattac cttattgtgt ggctctgtct gcagaaagca accggggcga 1380
ttttcttccg ataccgtggt tactttcaaa ttggaagaca gagacgtaca cacaaggcaa 1440
taattcaggg aacaattcca tccatccact gctataaaaag gcggtgttgg ggtgttgggt 1500
ctcttcagtt cagtgtgctc aagcaatctc aaagaacttg tcttctccat ccacaccgag 1560
tttttcggct tcttgacttg aag                                     1583

```

10 <210> 8

<211> 1516

<212> ADN

ES 2 457 218 T3

<213> *Setaria italica*

<400> 8

```

cctcttcctt tatttttgcc atcagcgtcg ttggtgaact ctcgcgctg ttaaagatgt   60
gtggttccg ctctttccaa atttccata taatgagtag agtgagactt tgcatagcct  120
tgcgcggtaa gtccagtatt gtagttatag aagtccatca ttccaatgca ttggatgagg  180
gttgccatgc agttggtctg atgcttggct gcgctaacca tgttgccgtt aaatccata  240
tcctccttgt gttcctgcac ttagcctaga tgggtgact agtttccatg gtttgtctgc  300
atagggtgca agtggcgttg tatggccatc cacgttttagc ctgcctatcc acggacccaa  360
ctcagttttg tgtaattagc cgcaagaaga atttgcattt tgccggcgcc cacgttttcc  420
agacagaaga gatttctggt gtttcgatgc agcccaggaa ctgtgcttta tatgccgatg  480
ctattgtata catgacggat cttgttagtt tctagaagat agtatcctct tccacttata  540
gaagctcctg acctatagcc ataggcgcaa cgatgctaga tgctaaatgt gaagtgtgta  600
tgctgttctc gatattgagg tcacagatcc agttgttact gatagcatcg tgaactgtcc  660
tattttgtct tcttgaaatg tcgaagagga gtggagcaat gtccttaggt gctggccatg  720
tagctagcca gaagtccaga agctagcctt ttgccatca ccaagagtga taacctatgca  780
ggcaacaaat acttgcattg ctgtctcgtc gcatgggatt tctatgttgg tccagggttt  840
ttccgggtgat gcctactcat gccaaagcca cctcagacgg agggctcgtg cgaatttctc  900
gaggtcagcc cctcgtattg cttcagttagg caggttttctg tccagttgac tttacattta  960
ccctcgggta gctgttggtc tcccgtcag aggaattttt tacggatctt gtctaagtct 1020
tggagcccct ctttaaggaa ataataaaag aagaaactac ttgtttttgc aatgataacg 1080
tacatacaga tatttctaaa gccatcaagt acctagcttg tctaaataac aagtgtgtcc 1140
tggacaagt atcgagtacc tgaaagcaac ctgctttgaa ttggaaagga taaaaattcg 1200
acaaggaacg acaaaaggag gcacatttct tgccggccag aaactattgg gtctttgcat 1260
ccttgtgaat tgataaacgt gctggtgtgt ttcaatgatg tccatgagat ggaatacaa 1320
agtcaagcac gccttattac cttattgtgt ggctctgtct gcagaaagca accgggcgca 1380
ttttcttccg ataccgtggt tactttcaaa ttggaagaca gagacgtaca cacaaggcaa 1440
taattcaggg aacaattcca tccatccact gctataaaag gcggtgttgg ggtgttgggt 1500
ctcttcagtt cagtgt                                     1516

```

5

<210> 9

<211> 1766

<212> ADN

10 <213> *Setaria italica*

<400> 9

ES 2 457 218 T3

tggtaaaatc aattcatatg cttatacttc aaaaaccaat ttatgtgtat atacttggaa 60  
 aaattagatt aagtatttca atttatttgc ttatatttca aaaataaatt cttgtgcata 120  
 tacttagaaa aattagatta agtatttcaa tttatttgc tatacttcaa aaatcaattc 180  
 ttgtgtatat acttacaaaa attagattaa gtatttcaat ttaattgctt atatttgaag 240  
 taagtcaatt gtgcaaacc attgatctac tatatatgta ataaactttg ccaatgacac 300  
 agatgatgta caggaaagat agaacttca agtggatttc ttctagacga ggtcataaat 360  
 ccagcggggg agtttcataa tgatgcatca aatctacagc accgtcagga ctccgggtta 420  
 gaatagtaga aatgatatgt gtacgcacaa tatgtctata tatatgtata atattattca 480  
 tatatgtgta tgcataatat gtatatatat aatagtatct taaatgtaat attgaagata 540  
 aatagaactt tatatatatt agcgtattag aagtagtata cgtatgaata tagaataaag 600  
 aaaaagaaaa taagaaaaga aaggaaaaaa acaaatcagt accggtcggg gagaccaacc 660  
 ggcaactaatt aggcocctta gtgcocctcc gccaccctct cctocctctt ctctcgcgc 720  
 cctctcctcc ctctcagctc ttcccagacc ctctctctcc cactgcccgc ccctccctct 780  
 ctccgcgcac caccatcgtc ctgctgctac tccctctct caccctcggc tgcccctcct 840  
 ctccccctc gctcaccct cactcgtggc agtgaggagc agcggcaaca catagatccg 900  
 gtggtggcag tgnaggctcc agtgaagaag gagctagcac ggatccgacg aagaaggagc 960  
 tggttgcggt ggcgtaggtg ggcggcctg ggggcgggc ctcaagctcc tctccccgta 1020  
 cgctctctc tctctctctc tatgagccgg atccgtagg accaaggcag ttggcggctg 1080  
 gtggggcggc aacggccaga tccagcgaga tgcggccggt cggatccggc gaggcagcgc 1140  
 aaggccgggg cgtaaggcgg ccggcagcac catttttttg tttttttaat aggccttcac 1200  
 cgccagttcc aaaaccagcg gtgatggggt atccccatca ctaccgaaag tcagacgatg 1260  
 gatccaaacc gacggtgaag actggtttg agccggcagt gatgaacctc tggagtagtg 1320  
 cttatggctg ggggcattga cattctttt actaacttcc ttcctaccac gtagtatgca 1380  
 ataattgtac gtaatactag tagctgatga taagtttgat ataagactat caagcggctc 1440  
 cgacatttca caatctcgtg cagcacatgg acagctatac taacgagaag tcgaggacga 1500  
 cagcccaccg acttgacaaa tctgtacaaa atatgctaga aaaatattgc accaatcaaa 1560  
 cattgcccat caaggccacc aaggatacat gatgacaacg gccaatcaga ctccaagat 1620  
 atctcaaat catacacaca gaaggaagag atgatgactc cagttaaact ttcacgacg 1680  
 actcctataa atacgacct ctctctgtac gcctcctcat tccaacacag gaacgggatt 1740  
 ctctctctt ctggccatta gctcca 1766

<210> 10

5 <211> 1726

<212> ADN

<213> *Setaria italica*

ES 2 457 218 T3

<400> 10

tggtaaaatc aattcatatg cttatacttc aaaaaccaat ttatgtgtat atacttgga 60  
 aaatagatt aagtatttca atttatttgc ttatatttca aaaataaatt cttgtgcata 120  
 tacttagaaa aattagatta agtatttcaa tttatttgc tatacttcaa aatcaattc 180  
 ttgtgtatat acttacaaa attagattaa gtatttcaat ttaattgctt atatttgaag 240  
 taagtcaatt gtgcaaacc attgatctac tatatatgta ataaactttg ccaatgacac 300  
 agatgatgta caggaaagat agaacttca agtggatttc ttctagacga ggtcataaat 360  
 ccagcggggg agtttcataa tgatgcatca aatctacagc accgtcagga ctcggttta 420  
 gaatagtaga aatgatatgt gtacgcacaa tatgtctata tatatgtata atattattca 480  
 tatatgtgta tgcataatat gtatatatat aatagtatct taaatgtaat attgaagata 540  
 aatagaactt tatatatatt agcgtattag aagtagtata cgtatgaata tagaataaag 600  
 aaaaagaaaa taagaaaaga aaggaaaaa acaaatcagt accggtcggg gagaccaacc 660  
 ggcaactaatt aggccttta gtgcctccc gccacctct cctcctctt ctctcgcgc 720  
 cctcctctc ctctcagctc ttcccgacc ctctctctc cactgcgcc cctcctctc 780  
 ctccgcgac caccatcgtc ctgcgtgatc tccctctct caccctcggc tgcctcctc 840  
 ctccccctc gctcaccct cactcgtggc agtgaggagc agcggcaaca catagatccg 900  
 gtgtggcag tgcaggttc agtgaagaag gagctagcac ggatccgac aagaaggagc 960  
 tggttgcggg ggcgtaggtg ggcgccctg gggcgcggc ctcagcttcc tctccccgta 1020  
 cgctctctc tctctctc tatgagccg atccggtagg accaaggcag ttggcggctg 1080  
 gtggggcggc aacggccaga tccagcgaga tggggccggt cggatccggc gaggcagcgc 1140  
 aaggccggg cgtaaggcgg ccggcagcac cattttttt ttttttaat aggccttcac 1200  
 cgccagttcc aaaaccagcg gtgatgggt atccccatca ctaccgaaag tcagacgatg 1260  
 gatccaaacc gacggtgaag actggtttg agccggcagt gatgaacctc tggagttagt 1320  
 cttatggctg ggggcattga cattctttt actaacttcc ttctaccac gtagtatgca 1380  
 ataattgtac gtaatactag tagctgatga taagtttgat ataagactat caagcgtct 1440  
 cgacatttca caatctcgtg cagcacatgg acagctatac taacgagaag tcgaggacga 1500  
 cagcccaccg acttgacaaa tctgtacaaa atatgctaga aaaatattgc accaatcaaa 1560  
 cattgccat caaggccacc aaggatacat gatgacaacg gccaatcaga cttcaagat 1620  
 atctcaacat catacacaca gaaggaagag atgatgactc cagttaact ttcacgacg 1680  
 actcctataa atacgacct cttcctgtac gctcctcat tccaac 1726

5

<210> 11

<211> 40

<212> ADN

<213> *Setaria italica*

ES 2 457 218 T3

<400> 11

acaggaacgg gattcttct tctctggcc attagctcca 40

5

<210> 12

<211> 1778

<212> ADN

<213> *Setaria italica*

10

<400> 12

tggtaaaatc aattcatatg cttatacttc aaaaaccaat ttatgtgtat atacttgga 60  
aaattagatt aagtatttca atttatttgc ttatatttca aaaataaatt cttgtgcata 120  
tacttagaaa aattagatta agtatttcaa tttatttgct tatacttcaa aatcaattc 180  
ttgtgtacat acttagaaaa attagattaa gtatttcaat ttaattgctt atatttgaag 240  
taagtcaatt gtgcaaacc c attgatctac tatatatgca ataaactttg ccaatgacac 300  
agatgatgta caggaaagat agaacttca agtggatttc ttctagacga ggtcataaat 360  
ccagcggggg agtttcataa tgatgcatca aatctacagc accgtcagga ctcgggttta 420  
gaatagtaga tatgatatgt gtacgcacaa tatgtctata tatatgtata atattattca 480  
tatatgtgta tgcataatat gtatatatat aatagtatct taaatgtaat attgaagata 540  
aatagaactt tatatatatt agcgtattag aagtagtata cgtaagaata tagaataaag 600  
aaaagaaaat aagaaaagaa aggaaaaaac aatcagtac cggttgggga gaccaaccgg 660  
cactaattag gccctttagt gccctccgc caccctctcc tccctcttct ctcgcgcgcc 720  
tctcctccct ctcagctcct ccgaccctt tctctccca ctgtcgcgcc ctcctctctc 780  
ccgcgcacca ccatcgtcgt gcgtgatctc cctctctca cctcggctg cccctctct 840  
cccccttcg ctcaccctc actcgtggca gtgaggagcg gcggcgggt gagagcagcg 900  
gcaacacata gatccggtgg tggcgtgca ggttccagt aagaaggagc tagcacggat 960  
ccgacgaaga aggagctggt tgcggtggcg taggtggcg gccctggcg cgcggcctca 1020  
gcttctctc ccgtaagcc tctctctctc tctatgagcc ggatccgta ggaccaaggc 1080  
agttggcgcg tgggtggcg gcaacggca gatccagcga gatgctgcc gtcggatccg 1140  
gcgaggcagc gcaaggccg ggcgtaaggc ggccggcagc accatTTTTT tgttttttta 1200

ES 2 457 218 T3

acaggccttc accgccagtt ccaaaaaccag cggatgatggg gtatccccat cactaccgaa 1260  
 agtcagacga tggatccaaa ccgacgggta agactggttt ggagccggca gtgatgaacc 1320  
 tctggagtag tgcttatggc tgggggcatt gacattcttt ttactaactt tcttctacc 1380  
 acgtagtatg caataattgt acgtaatact agtagctgat gataagtttg atataagact 1440  
 atcaagcggg ctcgacattt cacaatctcg tgcaacacat ggacagctat actaacgaga 1500  
 agtcgagAAC gacagcccac cgacttgaca aatctgtaca aaatatgcta gaaaaatatt 1560  
 gcaccaatca aacattgccc atcaaggcca ccaaggatac atgatgacaa cggccaatca 1620  
 gacttcaaag atatctcaac atcatacaca cagaaggaag agatgatgac tccagtttaa 1680  
 ctttcatcga cgactcctat aaatacgacc ctcttctgt acgcctctc attccaacac 1740  
 aggaacggga ttcttcttc ttctggccat tagctcca 1778

<210> 13

<211> 1738

5 <212> ADN

<213> *Setaria italica*

<400> 13

tggtaaaatc aattcatatg cttatacttc aaaaaccaat ttatgtgat atacttgaa 60  
 aaattagatt aagtatttca atttatttgc ttatatttca aaaataaatt cttgtgcata 120  
 tacttagaaa aattagatta agtatttcaa tttatttgct tatacttcaa aatcaattc 180  
 ttgtgtacat acttagaaaa attagattaa gtatttcaat ttaattgett atatttgaag 240  
 taagtcaatt gtgcaaaccc attgatctac tatatatgca ataaactttg ccaatgacac 300  
 agatgatgta caggaaagat agaattctca agtggatttc ttctagacga ggtcataaat 360  
 ccagcggggg agtttcataa tgatgcatca aatctacagc accgtcagga ctcgggttta 420  
 gaatagtaga tatgatatgt gtacgcacaa tatgtctata tatatgtata atattattca 480  
 tatatgtgta tgcataatat gtatatatat aatagtatct taaatgtaat attgaagata 540  
 aatagaactt tatatatatt agcgtattag aagtagtata cgtaagaata tagaataaag 600  
 aaaagaaaat aagaaaagaa aggaaaaaac aaatcagtac cggttgggga gaccaaccgg 660  
 cactaattag gccctttagt gccttccgc caccctctcc tccctctct ctcgcccgc 720  
 tctctccct ctcagctcct cccgaccct tcctctcca ctgtcgccc ctcctctcc 780  
 ccgccacca ccacgtcgt gcgtgatctc cctctctca cctcggctg cccctctct 840  
 cccccctcg ctcaccctc actcgtggca gtgaggagcg gcggcgggt gagagcagcg 900  
 gcaacacata gatccggtgg tggcggtgca ggttccagtg aagaaggagc tagcacggat 960

10

ES 2 457 218 T3

ccgacgaaga aggagctggt tgcggtggcg taggtgggcg gccctggcgg cgcggcctca 1020  
gcttcctctc cccgtacgcc tctctctctc tctatgagcc ggatccggta ggaccaaggc 1080  
agttggcggc tgggtggggcg gcaacggcca gatccagcga gatgctgccc gtcggatccg 1140  
gcgaggcagc gcaaggccgg ggcgtaaggc ggccggcagc accatttttt tgttttttta 1200  
acaggccttc accgccagtt ccaaaaccag cggatgatgg gtatcccat cactaccgaa 1260  
agtcagacga tggatccaaa ccgacggtga agactggttt ggagccggca gtgatgaacc 1320  
tctggagtag tgcttatggc tgggggcatt gacattcttt ttactaactt tcttctacc 1380  
acgtagtatg caataattgt acgtaatact agtagctgat gataagttg atataagact 1440  
atcaagcggc ctgcacattt cacaatctcg tgcaacacat ggacagctat actaacgaga 1500  
agtcgagaac gacagccac cgacttgaca aatctgtaca aaatagcta gaaaaatatt 1560  
gcaccaatca aacattgcc atcaaggcca ccaaggatac atgatgaca cggccaatca 1620  
gacttcaaag atatctcaac atcatacaca cagaaggaag agatgatgac tccagtttaa 1680  
ctttcatcga cgactcctat aaatacgacc ctcttctgt acgcctctc attccaac 1738

<210> 14

<211> 2128

5 <212> ADN

<213> *Setaria italica*

<400> 14

tatcggcgac cgctaagaga agacatttaa aataagtagt cggcattgtg ataaaaagag 60  
agcgcgatta ctgatgtgca ggttctcgat tgttgatgaa gtcgactagt cggagtcgat 120  
tctgactagt tattgattgt atggaacccg cctcgcacta gttttctagt cgagacgagt 180  
agtcgaagta gaccatcctc aactactttt ctagttgaga tgagtagtcg aagtagtcgt 240  
cggcgacttg attatttgcc tcaatctgtg tgtgacttga tcgacgagcc gtatgcagca 300  
gcttgccgtg gaaaccgact cagtcttcca ttggaacacg gagcgcgca attctatgtc 360  
gacgtagatt tgtctgcttg gaactccaac tcagtgactt gcttcttgtt gagtagattg 420  
atcttgatga tgaggtcctt caagctcgcc tgatgatctc gacgatcacc tctacctgac 480  
gcgccaactg ttggtgctta gaccagcaa cctaccgagg gggtagccga ggtagtgttt 540  
tgtggtgggg ctgctgaag atcaggaact tgaagtgaa ctgcaacaca cgatttagac 600  
aagttcgggc tgcttatgcc gcataatacc ccatgtcatg tgtgttggtt ggattgtatt 660  
gattgatcag atattggag ggggcctgc ctgccttat attgocatt gccggaggca 720  
gggctacagg tcggtgttg tacaagagta ctagtcggtt ttgaccagcg agtccactc 780  
taattgctac aagtagtttc ctaatccttg actagtcctt gtcgccacg tagaccagca 840

10

ES 2 457 218 T3

cgtcttgac ctagtctctg tgtttgatac atcttggtgt acagtccgat attgtaggac 900  
 tatccaagct tcccagtagg cccatagatg tatggccgac aactggataa tgtaactctg 960  
 ggtcagtact atccttatct atatagacac aaacaacgta ctatagcaga agttaaagct 1020  
 cgtaaccac caatatttgg tggcatagac cacgtattgc tgatatagtg ctcgtaacc 1080  
 accaatattt cgtggcatag agatctctta ggcaataaat tagcagtacg aaacaatcta 1140  
 tgtccacgtg ttgctaatac aatgttctaa accttacagc ctactggaca gttctctagc 1200  
 catgatacat gtgcatgtcc gaacaaatat ttatgggtac ccgaaagggt aattttttgt 1260  
 agtatttatg agggggaggg gggcgttgac gaaaaaata acttagctaa gcgtaattgg 1320  
 cttaaaaaca tacaatgttg ttccagcatc aagcctacgt gatcatttca caaaaccaac 1380  
 tcaaaagata ggtgtcatgt tccttttagt gcaaaactta aggacaccta ccttgcaaaa 1440  
 cttagctttg ttaccagaa tgaaccgcta agctcgagga gctctgaact tacatgacca 1500  
 aatatattaa acacaaaagt catgcatgat tttctttaat aagtatcgag caatatgggt 1560  
 cgggtgtctt tegtctcata cctctattgt cctccgtgat caacaagggt ggatccgggt 1620  
 ggtgcaaggg ggctcaagcc ccctacctc tcccaaagga gaaagaaggg agaagaaagt 1680  
 gaaggaagaa gaaacccct atattcta atgctacctc cactgctga tcaacacaac 1740  
 attcttaaaa ccatttctt ggcatttgcg catgttaca ggtacaaaag agccagccca 1800  
 tatgccaagt tactaaacta aactatgac caccatggag cgagaacaaa cgtcaacagg 1860  
 catcaaccaa tgcagcaatc ttgatcgcta gtactgtccg gcattatata tgaacaaat 1920  
 ccagatcacc catctcatca cagtcacatg cattcatggt cacggaacc gttagcaaac 1980  
 caccaactaa tcagcattgc aacactctc ctctataaa tgcagcgagc gggggacacc 2040  
 ataaaccatc acaggcactt aggatcaagt taattttgt tctgctttgt gcgcctgtgt 2100  
 tccagtaatt actttccgtg tagcaaaa 2128

<210> 15

<211> 2062

5 <212> ADN

<213> *Setaria italica*

<400> 15

tatcggcgac cgctaagaga agacatttaa aataagtagt cggcattgtg ataaaaagag 60  
 agcgcgatta ctgatgtgca ggttctcgat tgttgatgaa gtcgactagt cggagtcgat 120  
 tctgactagt tattgattgt atggaaccg ccctcgacta gttttctagt cgagacgagt 180  
 10 agtogaagta gaccatcctc aactactttt ctagttagaga tgagtgtcg aagtagtcg 240

ES 2 457 218 T3

cggcgacttg attatattgcc tcaatctgtg tgtgacttga tcgacgagcc gtatgcagca 300  
 gcttgcggtg gaaaccgact cagtcttcga ttggaacacg gagcgcgtca attctatgtc 360  
 gacgtagatt tgtctgcttg gaactccaac tcagtgactt gcttcttgtt gagtagattg 420  
 atcttgatga tgaggtcctt caagctcgcc tgatgatctc gacgatcacc tctacctgac 480  
 gcgccaactg ttggtgctta gaccagcaa cctaccgagg ggtaccoga ggtagtgttt 540  
 tgtggtgggg ctctcgaag atcaggaact tgaagtgaa ctcgaaaca cgatttagac 600  
 aagttcgggc tgcttatgcc gcataatacc ccatgtcatg tgtgttggtt ggattgtatt 660  
 gattgatcag atatttgag ggggccctgc ctgccttat attgcccatt gccggaggca 720  
 gggctacagg tcggttggtt tacaagagta ctagtcggtt ttgaccagcg agtcctactc 780  
 taattgctac aagtagtttc ctaatccttg actagtcctt gtccgccacg tagaccacga 840  
 cgtcttgcaac ctagtctctg tgtttgatac atcttggtgt acagtcgat attgtaggac 900  
 tatccaagct tcccagtagg cccatagatg tatggccgac aactggataa tgtaactctg 960  
 ggtcagtaact atccttatct atatagacac aaacaacgta ctatagcaga agtttaagct 1020  
 cgtaaccac caatatttg tggcatagac cacgtattgc tgatatagtg ctcgtaacc 1080  
 accaatattt cgtggcatag agatctctta ggcaataaat tagcagtacg aaacaatcta 1140  
 tgtccacgtg ttgctaatac aatgttctaa accttacagc ctactggaca gttctctagc 1200  
 catgatacat gtgcatgtcc gaacaaatat ttatgggtac ccgaaaggtt aattttttgt 1260  
 agtatttatg agggggaggg gggcgttgac gaaaaaata acttagctaa gcgtaattgg 1320  
 cttaaaaaaca tacaatggtt ttccagcacc aagcctacgt gatcatttca caaaaccaac 1380  
 tcaaaagata ggtgtcatgt tccttttagt gcaaaactta aggacaccta ccttgcaaaa 1440  
 cttagctttg ttaccagaa tgaaccgcta agctcgagga gctctgaact tacatgacca 1500  
 aatatattaa acacaaaagt catgcatgat tttctttaat aagtatcgag caatatggtt 1560  
 cgggtgtctt tcgtctcata cctctattgt cctccgtgat caacaagggt ggatccgggt 1620  
 ggtgcaaggg ggtcaagcc cccctacctc tcccaaagga gaaagaaggg agaagaaagt 1680  
 gaaggaagaa gaaaccctt atattcta atgtacctcg ccaactgctga tcaacacaac 1740  
 attottaaaa ccatttcctt ggcatttgcg catgttacia ggtacaaaag agcagccca 1800  
 tatgccaagt tactaaacta aactatgatc caccatggag cgagaacaaa cgtaacagc 1860  
 catcaaccaa tgcagcaatc ttgatcgcta gtactgtcgg gcattatata tgaacaaat 1920  
 ccagatcacc catctcatca cagtcacatg cattcatggt cacgggaacc gttagcaaac 1980  
 caccaactaa tcagcattgc aacactcttc ctctataaa tgcagcgagc gggggacacc 2040  
 ataaaccatc acaggcactt ag 2062

<210> 16

<211> 66

5 <212> ADN

<213> *Setaria italica*

ES 2 457 218 T3

<400> 16

gatcaagtta attttgtttc tgctttgtgc gcctgtgttc cagtaattac tttccgtgta 60  
gcaaaa 66

5 <210> 17

<211> 1629

<212> ADN

<213> *Setaria italica*

10 <400> 17

agaccagca acctaccgag ggggtaccog aggtagtgtt ttgtggtggg gctcgtcgaa 60  
gatcaggaac ttgaaggtga actcgaacac acgatttaga caagttcggg ctgcttatgc 120  
cgcataatac cccatgtcat gtgtgttggg tggattgtat tgattgatca gatatttgga 180  
gggggccctg cctcgcctta tattgcccac tgccggaggc agggctacag gtcggttggt 240  
gtacaagagt actagtcggt tttgaccagc gagtcctact ctaattgcta caagtagttt 300  
cctaatacctt gactagtctt tgtccgccac gtagaccacg acgtcttgca cctagtctct 360  
gtgtttgata catcttggg tacagtcoga tattgttaga ctatccaagc ttcccagtag 420  
gccatagat gtatggccga caactggata atgtaactct gggtcagtac tatccttatc 480  
tatatagaca caaacaacgt actatagcag aagtttaagc tcgtaacca ccaatatttg 540  
gtggcataga ccacgtattg ctgatatagt gctcgttaacc caccaatatt tcgtggcata 600  
gagatctctt aggcaataaa ttagcagtac gaaacaatct atgtccacgt gttgctaata 660  
caatgttcta aaccttacag cctactggac agttctctag ccatgatata tgtgcatgtc 720  
cgaacaaata tttatgggta cccgaaaggt taatttttg tagtatttat gagggggagg 780  
ggggcggtga cgaaaaaat aacttagcta agcgttaattg gcttaaaaac atacaatgtt 840  
gttccagcat caagcctacg tgatcatttc acaaaaccaa ctcaaagat aggtgtcatg 900  
ttccttttag tgcaaaaactt aaggacacct accttgcaa acttagcttt gttaccaga 960  
atgaaccgct aagctcgagg agctctgaac ttacatgacc aaatatatta aacacaaaag 1020  
tcatgcatga ttttctttaa taagtatcga gcaatatggt tcgggtgtct ttcgtctcat 1080  
acctctattg tcctccgtga tcaacaaggg tggatccggg tgggtcaagg gggctcaagc 1140  
ccccctacct ctcccaaagg agaaagaagg gagaagaag tgaaggaaga agaaaccccc 1200

ES 2 457 218 T3

tatattctaa tgctacctcc gccactgctg atcaacacaa cattcttaaa accatttct 1260  
 tggcatttgc gcatgttaca aggtacaaaa gagccagccc atatgccaag ttactaaact 1320  
 aaactatgat ccaccatgga gcgagaacaa acgtcaacag gcatcaacca atgcagcaat 1380  
 cttgatcgct agtactgtcc ggcatatat ctgaaacaaa tccagatcac ccatctcatc 1440  
 acagtacat gcattcatgg tcacgggaac cgttagcaaa ccaccaacta atcagcattg 1500  
 caaactctt cctcctataa atgcagcgag cgggggacac cataaacat cacaggcact 1560  
 taggatcaag ttaattttgt ttctgctttg tgcgcctgtg ttccagtaat tactttcctg 1620  
 gtagcaaaa 1629

<210> 18

<211> 1563

5 <212> ADN

<213> *Setaria italica*

<400> 18

agaccagca acctaccgag ggggtaccgg aggtagtgtt ttgtggtggg gctcgtcgaa 60  
 gatcaggaac ttgaaggtga actcgaacac acgatttaga caagttcggg ctgcttatgc 120  
 cgcataatac cccatgtcat gtgtgttggg tggattgtat tgattgatca gatatttggg 180  
 gggggccctg cctcgcctta tattgcccat tgccggaggc agggctacag gtcggttgtt 240  
 gtacaagagt actagtcggt ttgaccagc gagtcctact ctaattgcta caagtagttt 300  
 cctaatectt gactagtctt tgcgccac gtagaccacg acgtcttgca cctagtctct 360  
 gtgtttgata catcttggg tacagtccga tattgtagga ctatccaagc ttcccagtag 420  
 gccatagat gtatggcga caactggata atgtaactct gggtcagtac tatccttacc 480  
 tatatagaca caaacaacgt actatagcag aagtttaagc tcgtaacca ccaatatttg 540  
 gtggcataga ccacgtattg ctgatatagt gctcgttaacc caccaatatt tctgtggcata 600  
 gagatctctt aggcaataaa ttagcagtac gaaacaatct atgtccacgt gttgctaata 660  
 caatgttcta aaccttacag cctactggac agttctctag ccatgatata tctgcatgtc 720  
 cgaacaaata tttatgggta cccgaaaggt taattttttg tagtatttat gagggggagg 780  
 ggggcggtga cgaaaaaat aacttagcta agcgttaattg gcttaaaaac atacaatgtt 840  
 gttccagcat caagcctacg tgatcatttc acaaaaccaa ctcaaaagat aggtgtcatg 900  
 ttccttttag tgcaaaactt aaggacacct accttgcaaa acttagcttt gttaccaga 960  
 atgaaccgct aagctcgagg agctctgaac ttacatgacc aaatatatta aacacaaaag 1020  
 tcatgcatga ttttctttaa taagtatcga gcaatatggt tcgggtgtct ttcgtctcat 1080  
 acctctattg tcctccgtga tcaacaaggg tggatccggg tgggtcaagg gggctcaagc 1140

10

ES 2 457 218 T3

ccccctacct ctcccaaagg agaaagaagg gagaagaaag tgaaggaaga agaaaccccc 1200  
 tatattctaa tgctacctcc gccactgctg atcaacacaa cattcttaaa accatttcct 1260  
 tggcatttgc gcatgttaca aggtacaaaa gagccagccc atatgccaag ttactaaact 1320  
 aaactatgat ccaccatgga gcgagaacaa acgtcaacag gcatcaacca atgcagcaat 1380  
 cttgatcgct agtactgtcc ggcatatat ctgaaacaaa tccagatcac ccatctcacc 1440  
 acagtacat gcattcatgg tcacgggaac cgttagcaaa ccaccaacta atcagcattg 1500  
 caacactctt cctcctataa atgcagcgag cgggggacac cataaacat cacaggcact 1560  
 tag 1563

<210> 19

<211> 981

5 <212> ADN

<213> *Setaria italica*

<400> 19

gtgttgctaa tacaatgttc taaaccttac agcctactgg acagttctct agccatgata 60  
 catgtgcatg tccgaacaaa tatttatggg tacccgaaag gttaattttt tgtagtattt 120  
 atgaggggga gggggcggtt gacgaaaaaa ataacttagc taagcgtaat tggcttaaaa 180  
 acatacaatg ttgttcagc atcaagccta cgtgatcatt tcacaaaacc aactcaaaag 240  
 ataggtgtca tgttcctttt agtgcaaaac ttaaggacac ctaccttgca aaacttagct 300  
 ttgttaccba gaatgaaccg ctaagctcga ggagctctga acttacatga ccaaataat 360  
 taaacacaaa agtcatgcat gattttcttt aataagtatc gagcaaatag gttcgggtgt 420  
 ctttcgtctc atacctctat tgcctccgt gatcaacaag ggtggatccg ggtgggtgca 480  
 gggggctcaa gccccctac ctctcccaaa ggagaaagaa gggagaagaa agtgaaggaa 540  
 gaagaaacc cctatattct aatgctacct ccgccactgc tgatcaacac aacattctta 600  
 aaaccatttc cttggcattt gcgcatgtta caaggtacaa aagagccagc ccatatgcca 660  
 agttactaaa ctaaactatg atccaccatg gagcgagaac aaacgtcaac aggcataaac 720  
 caatgcagca atcttgatcg ctagtactgt ccggcattat atctgaaaca aatccagatc 780  
 acccatctca tcacagtcac atgcattcat ggtcacggga accgtagca aaccaccaac 840  
 taatcagcat tgcaaacctc ttctcctat aatgcagcg agcgggggac accataaac 900  
 atcacaggca cttaggatca agttaatfff gtttctgctt tgtgcgctg tgttccagta 960  
 10 attactttcc gtgtagcaaa a 981

<210> 20

<211> 915

# ES 2 457 218 T3

<212> ADN

<213> *Setaria italica*

<400> 20

5

```

gtgttgctaa tacaatgttc taaaccttac agcctactgg acagttctct agccatgata 60
catgtgcatg tccgaacaaa tatttatggg taccgaaag gttaattttt tgtagtattt 120
atgaggggga gggggcggtt gacgaaaaaa ataacttagc taagcgtaat tggettataa 180
acatacaatg ttgttccagc atcaagccta cgtgatcatt tcacaaaacc aactcaaaag 240
ataggtgtca tgttcctttt agtgcaaaac ttaaggacac ctaccttgca aaacttagct 300
ttgttaccba gaatgaaccg ctaagctcga ggagctctga acttacatga ccaaatatat 360
taaacacaaa agtcatgcat gattttcttt aataagtatc gagcaatatg gttcgggtgt 420
ctttcgtctc atacctctat tgtcctccgt gatcaacaag ggtggatccg ggtggtgcaa 480
gggggctcaa gccccctac ctctcccaaa ggagaaagaa gggagaagaa agtgaaggaa 540
gaagaaacc cctatattct aatgctacct ccgccactgc tgatcaaac aacattctta 600
aaaccatttc cttggcattt gogcatgtta caaggtacaa aagagccagc ccatatgcca 660
agttactaaa ctaaactatg atccaccatg gagcgagaac aaacgtcaac aggcataaac 720
caatgcagca atcttgatcg ctagfactgt ccggcattat atctgaaaca aatccagatc 780
accatctca tcacagtcac atgcattcat ggtcacggga accgttagca aaccaccaac 840
taatcagcat tgcaaacctc ttctctctat aaatgcagcg agcgggggac accataaac 900
atcacaggca cttag 915

```

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de ADN que comprende un elemento regulador que tiene una secuencia de ADN seleccionada de:
- (a) una secuencia con al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con la longitud completa de una secuencia de ADN seleccionada de las SEC ID N° 1-2 con actividad de promotor,
- 5 (b) una secuencia seleccionada de las SEC ID N° 1-2, y
- (c) un fragmento que comprende al menos 95 nucleótidos contiguos de la secuencia de (a) o (b) con actividad de promotor,
- en la que dicho elemento regulador está unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga.
- 10 2. Una construcción de ADN que comprende un elemento regulador que tiene una secuencia de ADN seleccionada de:
- (a) una secuencia con al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con la longitud completa de una secuencia de ADN seleccionada de las SEC ID N° 1-2 con actividad de promotor,
- (b) una secuencia seleccionada de las SEC ID N° 1-2, y
- 15 (c) un fragmento que comprende al menos 95 nucleótidos contiguos de la secuencia de (a) o (b) con actividad de promotor,
- en la que dicho elemento regulador está unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga.
- 20 3. La construcción de ADN de la reivindicación 2, en la que la molécula de polinucleótido transcribible es un gen de interés agronómico.
4. La construcción de ADN de la reivindicación 2, en la que la molécula de polinucleótido transcribible es un gen capaz de proporcionar resistencia a herbicidas en las plantas.
5. La construcción de ADN de la reivindicación 2, en la que la molécula de polinucleótido transcribible es un gen capaz de proporcionar control de plagas de las plantas en plantas.
- 25 6. Una célula vegetal transgénica transformada de manera estable con la molécula de ADN de la reivindicación 1.
7. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 6, en la que dicha célula vegetal transgénica es una célula de planta monocotiledónea.
8. Una planta transgénica transformada de manera estable con la molécula de ADN de la reivindicación 1.
9. Una parte de la planta de la planta transgénica de la reivindicación 8, en el que la parte de la planta comprende la molécula de ADN.
- 30 10. Una semilla de la planta transgénica de la reivindicación 8, en la que la semilla comprende la molécula de ADN.



1516 nt [REDACTED] SEC ID N° 8

483 nt [REDACTED] SEC ID N° 5

FIGURA 2



```

SEQ ID NO:10 CAGCTTCCTCTCCCCGTACGCCTCTCTCTCTCTCTCTATGAGCCGGATCCGGTAGGAC
SEQ ID NO:13 CAGCTTCCTCTCCCCGTACGCCTCTCTCTCTCTCTCT----ATGAGCCGGATCCGGTAGGAC
*****-----*****
SEQ ID NO:10 CAAGGCAGTTGGCGGCTGGTGGGGCGGCAACGGCCAGATCCAGCGAGATGCGGCCGGTCCG
SEQ ID NO:13 CAAGGCAGTTGGCGGCTGGTGGGGCGGCAACGGCCAGATCCAGCGAGATGCTGCCGGTCCG
*****
SEQ ID NO:10 GATCCGGCGAGGCAGCGCAAGGCCGGGGCGTAAGGCGCCGGCAGCACCATTTTTTTGTT
SEQ ID NO:13 GATCCGGCGAGGCAGCGCAAGGCCGGGGCGTAAGGCGCCGGCAGCACCATTTTTTTGTT
*****
SEQ ID NO:10 TTTTAAATAGGCCTTCACCGCCAGTTCAAAACCAGCGGTGATGGGGTATCCCCATCACT
SEQ ID NO:13 TTTTAAACAGGCCTTCACCGCCAGTTCAAAACCAGCGGTGATGGGGTATCCCCATCACT
*****
SEQ ID NO:10 ACCGAAAGTCAGACGATGGATCCAAACCGACGGTGAAGACTGGTTTGAGCCGGCAGTGA
SEQ ID NO:13 ACCGAAAGTCAGACGATGGATCCAAACCGACGGTGAAGACTGGTTTGAGCCGGCAGTGA
*****
SEQ ID NO:10 TGAACCTCTGGAGTAGTGCTTATGGCTGGGGGCATTGACATTCCTTTACTAACTTTCTT
SEQ ID NO:13 TGAACCTCTGGAGTAGTGCTTATGGCTGGGGGCATTGACATTCCTTTACTAACTTTCTT
*****
SEQ ID NO:10 CCTACCACGTAGTATGCAATAATTGTACGTAATACTAGTAGCTGATGATAAGTTTGATAT
SEQ ID NO:13 CCTACCACGTAGTATGCAATAATTGTACGTAATACTAGTAGCTGATGATAAGTTTGATAT
*****
SEQ ID NO:10 AAGACTATCAAGCGGTCTCGACATTTACAATCTCGTGCAACACATGGACAGCTATACTA
SEQ ID NO:13 AAGACTATCAAGCGGTCTCGACATTTACAATCTCGTGCAACACATGGACAGCTATACTA
*****
SEQ ID NO:10 ACGAGAAGTCGAGGACGACAGCCCACCGACTTGACAAATCTGTACAAAATATGCTAGAAA
SEQ ID NO:13 ACGAGAAGTCGAGAACGACAGCCCACCGACTTGACAAATCTGTACAAAATATGCTAGAAA
*****
SEQ ID NO:10 AATATTGCACCAATCAAACATTGCCATCAAGGCCACCAAGGATACATGATGACAACGGC
SEQ ID NO:13 AATATTGCACCAATCAAACATTGCCATCAAGGCCACCAAGGATACATGATGACAACGGC
*****
SEQ ID NO:10 CAATCAGACTTCAAAGATATCTCAACATCATAACACAGAGGAGAGATGATGACTCCA
SEQ ID NO:13 CAATCAGACTTCAAAGATATCTCAACATCATAACACAGAGGAGAGATGATGACTCCA
*****
SEQ ID NO:10 GTTTAACTTTTCATCGACGACTCCTATAAATACGACCCTCTTCCTGTACGCCCTCCTCATTC
SEQ ID NO:13 GTTTAACTTTTCATCGACGACTCCTATAAATACGACCCTCTTCCTGTACGCCCTCCTCATTC
*****
SEQ ID NO:10 CAAC
SEQ ID NO:13 CAAC
****

```

FIGURA 3B