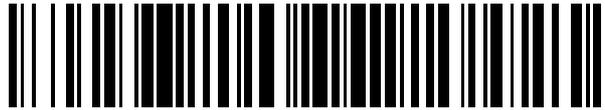


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 908**

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 13160671 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2607489**

54 Título: **Elementos reguladores de plantas y sus usos**

30 Prioridad:

07.04.2008 US 42957 P

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

09.03.2016

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 2 562 908 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 sus usos

Antecedentes

5 Los elementos reguladores son elementos genéticos que regulan la actividad genética modulando la transcripción de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que se unen operativamente. Tales elementos incluyen promotores, líderes, intrones, y regiones 3' sin traducir, que son útiles en el campo de la biología molecular de plantas y modificación genética de plantas.

El documento 2007/0130645 describe promotores del maíz que dirigen la expresión *inter alia* en las raíces.

Sumario de la invención

10 La presente invención proporciona nuevos elementos reguladores del mijo (*Setaria italica* (L.) Beauv) para su uso en plantas. En particular la invención proporciona una molécula de ADN que comprende un elemento regulador que tiene una secuencia de ADN que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

15 (a) una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 por ciento con la secuencia de longitud completa de ADN que se selecciona de entre las SEC ID N°: 14, 15 y 17 y que tiene actividad genética reguladora,

(b) una secuencia que se selecciona de entre las SEC ID N°: 14, 15 y 17-20, y

(c) un fragmento que comprende al menos 250 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN que se selecciona de entre las SEC ID N°: 14, 15 y 17-20 con actividad promotora,

20 en que dicho elemento regulador está unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir.

La presente invención proporciona también construcciones de ADN que comprenden los elementos reguladores. La presente invención proporciona también células vegetales transgénicas, plantas y semillas que comprenden los elementos reguladores unidos operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir.

Breve descripción de los dibujos

25 La **Figura 1** ilustra las tres variantes promotoras diseñadas a partir de los elementos reguladores del gen de proteína de transferencia de lípidos. La SEC ID N° 15 es P-SETit.Rcc3-1:1:1 y tiene una longitud de 2062 pares de bases de nucleótidos; la SEC ID N° 18 es P-SETit.Rcc3-1:1:10 y tiene una longitud de 1563 pares de bases de nucleótidos.

30 La **Figura 2** ilustra las dos variantes promotoras diseñadas a partir de los elementos reguladores del gen de la proteína tipo metalotioneína. La SEC ID N° 5 es P-SETit.Mtha-1:1:1 y tiene 483 pares de bases de larga; la SEC ID N° 8 es P-SETit.Mthb-1:1:2 y tiene 1516 pares de bases de longitud.

35 Las **Figuras 3A y 3B** ilustran colectivamente un alineamiento de secuencia producida con el uso de alineamiento de secuencias múltiples de las dos variantes alélicas de los promotores a partir del gen de la proteína relacionada con la deshidratación. En el consenso bajo las secuencias alineadas, las coincidencias se marcan con "*", la no coincidencias se marcan con ".", y las eliminaciones/inserciones se marcan con "-". Las dos variantes alélicas tienen idénticas secuencias líder, pero las secuencias promotoras eran variantes de la secuencia cuando se alineaban. La SEC ID N° 10 es P-SETit.DRPa-1:1:1 y la SEC ID N° 13 es P-SETit.DRPb-1:1:1.

Descripción detallada de la invención

40 Las definiciones y procedimientos siguientes se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos habitados en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos de que se señale otra cosa, los términos se entienden de acuerdo al uso convencional de los expertos habitados en la técnica relevante.

Moléculas de ADN

45 Como se utiliza en el presente documento el término "ADN" o "molécula de ADN" se refiere a una molécula de ADN de doble cadena de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases de desoxirribonucleótidos o una molécula de polinucleótido, que se lee desde el extremo 5' (corriente arriba) hasta el extremo 3' (corriente abajo). Como se utiliza en el presente documento, la expresión "secuencia de ADN" se refiere a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN. La nomenclatura que se utiliza en el presente documento es la requerida por el Título 37 del Código de Estados Unidos de Regulaciones Federales § 1.822 y se expone en las tablas del WIPO Standard ST.25 (1998), Apéndice 2, Tablas 1 y 3.

50 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de ADN aislada" se refiere a una molécula de ADN que está separada al menos parcialmente de otras moléculas a las que está asociada normalmente en su estado nativo o natural. En una realización, el término "aislado" se refiere a una molécula de ADN que está separada

al menos parcialmente de los ácidos nucleicos que flanquean normalmente la molécula de ADN en su estado nativo o natural. Por lo tanto, las moléculas de ADN fusionadas con 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 incluso cuando se integran en el cromosoma de una célula huésped o están presentes en una solución de ácido nucleico con otras moléculas de ADN.

Se puede utilizar cualquiera de varios procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para aislar y modificar una molécula de ADN, o un fragmento de la misma, que se desvelan en la presente invención. Por ejemplo, se puede utilizar la tecnología PCR (reacción en cadena de polimerasa) para amplificar una molécula particular de ADN de partida y/o producir variantes de la molécula original. Las moléculas de ADN, o fragmentos de las mismas, también se pueden obtener por otras técnicas tales como por síntesis directamente del fragmento por medios químicos, como se practica comúnmente utilizando un sintetizador de oligonucleótidos automático.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "identidad de secuencia" se refiere a la extensión en la que son idénticas dos secuencias de polinucleótidos alineadas óptimamente. Un alineamiento de secuencia óptimo se crea por el alineamiento manual de dos secuencias, por ejemplo, una secuencia de referencia y otra secuencia, maximizando el número de coincidencias de nucleótidos en el alineamiento de secuencia con las apropiadas inserciones, eliminaciones o huecos internos de nucleótidos. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia proporcionada en las SEC ID N°: 14, 15 y 17-20.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje de identidad" o "% de identidad" es la fracción de identidad 100 veces. La "fracción de identidad" de una secuencia que está alineada óptimamente con una secuencia de referencia es el número de coincidencias de nucleótidos en el alineamiento óptimo, dividido por el número total de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos, por ejemplo, el número total de nucleótidos en la longitud completa de la secuencia de referencia entera. Por lo tanto, una realización de la invención es una molécula de ADN que comprende una secuencia que cuando se alinea óptimamente con una secuencia de referencia, que se proporciona en el presente documento como las SEC ID N°: 14, 15 y 17-20, tiene aproximadamente una identidad del 95 por ciento o más, o al menos una identidad de 96 por ciento, una identidad del 97 por ciento, una identidad del 98 por ciento, o una identidad del 99 por ciento respecto a la secuencia de referencia y tiene actividad genética reguladora.

Elementos reguladores

Un elemento regulador es una molécula de ADN que tiene actividad reguladora, es decir, la que tiene la capacidad de afectar a la transcripción y/o la traducción de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que está unida operativamente. La expresión "actividad genética reguladora" por tanto se refiere a la capacidad para afectar el patrón de expresión de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que está unido operativamente afectando la transcripción y/o traducción de la molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que se une operativamente. La actividad genética reguladora puede ser positiva y/o negativa y el efecto se puede caracterizar por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo, tisulares, ambientales, fisiológicas, patológicas, de ciclo celular, y/o de reaccionar 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 actividad genética reguladora y tienen un papel en una parte integral en la expresión total de genes en células vivas. La expresión "elemento regulador" se refiere a una molécula de ADN que tiene actividad genética reguladora, es decir, que tiene la capacidad de afectar la transcripción y/o traducción de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que está unida operativamente. Los elementos reguladores aislados, tales como promotores y líderes, que funcionan en plantas y por lo tanto son útiles para modificar los fenotipos vegetales por medio de los procedimientos de modificación genética.

Los elementos reguladores se pueden caracterizar por su patrón de expresión, es decir, como constitutivo y/o por su patrón de expresión temporal, espacial, de desarrollo, tisular, ambiental, fisiológica, patológica, de ciclo celular, y/o de reaccionar químicamente, y cualquier combinación de los mismos, así como por las indicaciones cuantitativas o cualitativas. Un promotor es útil como elemento regulador para modular la expresión de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que está unido operativamente.

Como se utiliza en el presente documento, un "patrón de expresión genética" es cualquier patrón de transcripción de una molécula de ADN unida operativamente en una molécula de ARN que se transcribe. La expresión se puede caracterizar por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo, tisulares, ambientales, fisiológicas, patológicas, de ciclo celular, y/o de reaccionar químicamente así como por las indicaciones cuantitativas o cualitativas. La molécula de ARN que se ha transcrito se puede traducir para producir una molécula de proteína o puede proporcionar una molécula de ARN antisentido u otra molécula reguladora, tal como un dsARN, un rARN y un miARN.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "expresión proteica" es cualquier patrón de traducción de una molécula de ARN que se transcribe en una molécula de proteína. La expresión proteica se puede caracterizar

por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo, o morfológicas así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas.

Como se utiliza 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 II y otras proteínas (factores de transcripción que actúan como trans) para iniciar la transcripción. Un promotor se puede aislar inicialmente a partir de la región 5’ no traducida (5’ UTR) de una copia genómica de un gen. De manera alternativa, los promotores pueden ser moléculas de ADN producidas sintéticamente o modificadas. Los promotores también pueden ser quiméricos, es decir, un promotor que se produce por medio 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° 20 o fragmentos o variantes de la misma.

En una realización, se proporcionan fragmentos de una secuencia promotora que se desvela en el presente documento. Los fragmentos de un promotor pueden tener actividad promotora, y pueden ser útiles solos o en combinación con otros promotores y fragmentos de promotor, tal como en la construcción de promotores quiméricos. En realizaciones específicas, se proporcionan fragmentos de un promotor que comprenden al menos aproximadamente 250, 500, o aproximadamente 750 nucleótidos contiguos de una molécula de polinucleótido que tiene la actividad promotora desvelada en el presente documento. Tales fragmentos pueden tener al menos aproximadamente un 85 por ciento, aproximadamente un 90 por ciento, aproximadamente un 95 por ciento, aproximadamente un 98 por ciento, o aproximadamente un 99 por ciento, o más, de identidad con una secuencia de referencia cuando se alinea óptimamente con la secuencia de referencia.

Un promotor o fragmento de promotor se puede analizar también por la presencia de elementos promotores conocidos, es decir, característicos, en la secuencia de ADN, tales como TATA-box y otros motivos conocidos del sitio de unión del factor de transcripción. La identificación de tales elementos promotores conocidos se pueden utilizar por un experto en la técnica para diseñar variantes del promotor que tienen un patrón de expresión similar al promotor original.

Como se utiliza en el presente documento, el término “amplificador” o “elemento amplificador” se refiere a un elemento que actúa como regulador cis de la transcripción, el elemento cis a.k.a., que confiere un aspecto del patrón de expresión completo, pero que habitualmente es insuficiente solo para dirigir la transcripción, de una secuencia de nucleótido a la que está unido operativamente. A diferencia de los promotores, los elementos amplificadores no incluyen habitualmente un sitio de inicio de la transcripción (TSS) o TATA box. Un promotor puede comprender naturalmente uno o más elementos amplificadores que afectan la transcripción de una secuencia de polinucleótido a la que están unidos operativamente. Un elemento amplificador aislado también puede fusionarse con un promotor para producir un elemento promotor cis quimérico, que confiere un aspecto de la modulación total de la expresión genética. Un promotor o fragmento de promotor puede comprender uno o más elementos amplificadores que efectúan la transcripción de genes unidos operativamente. Se cree que muchos elementos amplificadores se unen a proteínas de unión a ADN y/o afectan la topología del ADN, produciendo conformaciones locales que permiten o restringen selectivamente el acceso de ARN polimerasa a la estructura de ADN o que facilitan la apertura selectiva de la doble hélice en el sitio del inicio de la transcripción. Un elemento amplificador puede funcionar para unir factores de transcripción que regulan la transcripción. Algunos elementos amplificadores se unen a más de un factor de transcripción, y los factores de transcripción pueden interactuar con diferentes afinidades con más de un dominio amplificador. Los elementos amplificadores pueden identificarse por varias técnicas, incluyendo el análisis de eliminación, es decir, eliminando uno o más nucleótidos del extremo 5’ o internos de un promotor; análisis de proteína de unión a ADN que utiliza la huella de DNasa 1, interferencia por metilación, ensayos de electroforesis de cambio de movilidad, huella genómica in vivo por PCR mediada por ligadura, y otros ensayos convencionales; o por análisis de similitud de secuencia de ADN utilizando motivos de elementos cis conocidos o elementos amplificadores como secuencia diana o motivo diana con procedimientos de comparación de secuencia de ADN, tal como BLAST. La estructura detallada de un dominio amplificador se puede estudiar adicionalmente por mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o por otros procedimientos convencionales. Los elementos amplificadores se pueden obtener por síntesis química o por aislamiento a partir de elementos reguladores que incluyen tales elementos, y se pueden sintetizar con los nucleótidos adicionales que lo flanquean que contienen sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar la modificación posterior. Por lo tanto, el diseño, construcción y uso de los elementos amplificaciones de acuerdo con los procedimientos que se desvelan en el presente documento para la modulación de la expresión de moléculas de polinucleótido que se pueden transcribir a las que están unidos operativamente están englobados en la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, el término “líder” se refiere a una molécula de ADN que se aísla a partir de una región 5’ sin traducir (5’ UTR) de una copia genética de un gen y se define generalmente como un segmento de nucleótido entre el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y el sitio de inicio de la secuencia que codifica la proteína. De manera alternativa los líderes pueden ser moléculas de ADN producidos sintéticamente o modificados. Un líder se puede utilizar como un elemento regulador 5’ para modular la expresión de una molécula de polinucleótido a la que está unido operativamente. Las moléculas líderes se pueden utilizar con un promotor heterólogo o con su promotor nativo. Las moléculas promotoras de la presente invención pueden por lo tanto unirse operativamente a su líder nativo o se pueden unir operativamente a un líder heterólogo. Los líderes útiles en la práctica de la presente invención incluyen la SEC ID N° 16 o fragmentos o variantes de la misma.

Como se utiliza en el presente documento, el término “quimérico” se refiere a una única molécula de ADN que se produce por la fusión de una primera molécula de ADN con una segunda molécula de ADN, donde ni la primera ni la segunda molécula de ADN se encuentran de otra manera normalmente en la naturaleza. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “promotor quimérico” se refiere a un promotor que se produce por medio de tal modificación de moléculas de ADN. Un promotor quimérico puede combinar dos o más fragmentos de ADN; un ejemplo sería la fusión de un elemento promotor a un amplificador. Por lo tanto, el diseño, construcción y uso de los promotores quiméricos de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento para la modulación de moléculas de polinucleótido que se pueden transcribir a las que están unidos operativamente están englobados en la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, el término “variante” se refiere a una segunda molécula de ADN que es similar en composición, pero no idéntica, a una primera molécula de ADN y la segunda molécula de ADN mantiene aún la funcionalidad general, es decir, el mismo o similar patrón de expresión, que 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 la que tiene diferentes sitios de enzimas de restricción y/o eliminaciones, sustituciones, y/o inserciones internas. En la presente invención, se puede utilizar una secuencia que se proporciona como las SEC ID N°: 14, 15 y 17-20 para crear variantes que tienen una composición similar, pero no idéntica, a la secuencia de polinucleótido del elemento regulador original, aunque aún mantiene la funcionalidad general, es decir, el mismo o similar patrón de expresión, que el elemento regulador original. La producción de tales variantes de la presente invención está claramente en la experiencia de la técnica de la divulgación y está englobada en el ámbito de la presente invención.

Construcciones

Como se utiliza en el presente documento, el término “construcción” significa cualquier molécula de polinucleótido recombinante tal como un plásmido, cósmido, virus, molécula de polinucleótido que se replica autónomamente, fago, o molécula de polinucleótido ADN o ARN de doble cadena o cadena sencilla circular o lineal, derivada de cualquier fuente, que es capaz de la integración genómica o la replicación autónoma, que comprende una molécula de polinucleótido en que se han unido una o más moléculas de polinucleótido de una manera funcionalmente operativa, es decir, unidas operativamente. Como se utiliza en el presente documento, el término “vector” significa cualquier construcción de polinucleótido recombinante que se puede utilizar con el fin de transformación, es decir, la introducción de ADN heterólogo en una célula huésped.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “unido operativamente” se refiere a una primera molécula que se une a una segunda molécula, en que las moléculas se disponen de forma que la primera molécula afecta a la función de la segunda molécula. Las dos moléculas pueden ser parte o no de una única molécula contigua y puede estar adyacente o no. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir si el promotor modula la transcripción de la molécula de polinucleótido que se puede transcribir de interés en una célula.

Las construcciones de la presente invención son generalmente construcciones ADN en plásmidos Ti con doble borde que tienen las regiones de borde derecho (RB o AGRtu.RB) y el borde izquierdo (LB o AGRtu.LB) del plásmido Ti aisladas de *Agrobacterium tumefaciens* que comprenden un T-ADN, que junto con las moléculas de transferencia proporcionadas por las células de *Agrobacterium tumefaciens*, permiten la integración del T-ADN en el genoma de una célula vegetal (véase por ejemplo, la Patente de EE. UU. 6.603.061). Las construcciones pueden también contener los segmentos estructurales del ADN del plásmido que proporcionan la función de replicación y selección por antibióticos en células bacterianas, por ejemplo, un origen de replicación en *Escherichia coli* tal como *ori322*, un origen de replicación con un amplio intervalo de huéspedes tal como *oriV* o *oriRi*, y una región codificante de un marcador genético tal como Espec/Estrp que codifica la Tn7 aminoglucósido adeniltransferasa (*aadA*) que confiere resistencia a la espectinomicina o estreptomycin, o un gen marcador genético de gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación de plantas, la cepa bacteriana huésped es a menudo *Agrobacterium tumefaciens* ABI, C58, o LBA4404; sin embargo pueden funcionar otras cepas conocidas por los expertos en la técnica de transformación de plantas de la presente invención.

Se conocen procedimientos en la técnica para ensamblar e introducir construcciones en una célula de tal manera que se transcriba la molécula de polinucleótido que se puede transcribir en una molécula funcional de ARNm que se traduce y se expresa como un producto proteico. Para la práctica de la presente invención, las composiciones convencionales y procedimientos para preparar y utilizar construcciones y células huésped son bien conocidas por el experto en la técnica, véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición Volúmenes 1, 2, y 3 (2000) J.F. Sambrook, D.W. Russell, y N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Los procedimientos para producir vectores recombinantes adecuados para la transformación de plantas incluyen, sin limitación, los que se describen en las Patentes de EE. UU. N°s 4.971.908; 4.940.835; 4.769.061; y 4.757.011 en su totalidad. Estos tipos de vectores se han revisado también en la literatura científica (véase, por ejemplo, Rodríguez, y col., Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston, (1988) y Glick, y col., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, 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 plásmido (Ti) inductor de tumores de *Agrobacterium tumefaciens* (Rogers, y col., Methods in Enzymology, 153:

253-277 (1987)). Otros vectores recombinantes útiles para la transformación de plantas, incluyendo el vector de control de transferencia pCAMVCN, también se han descrito en la literatura científica (véase, por ejemplo, Fromm, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 5824-5828 (1985)).

5 Se pueden incluir varios elementos reguladores en una construcción. Cualquiera de tales elementos reguladores se puede proporcionar en combinación con otros elementos reguladores. Tales combinaciones se pueden diseñar o modificar para producir características reguladoras deseables. Las construcciones de la presente invención típicamente comprenderían al menos un elemento regulador unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir unida operativamente a una molécula de terminación de la transcripción 3'.

10 Las construcciones de la presente invención pueden incluir cualquier promotor o líder que se conoce en la técnica. Por ejemplo, un promotor de la presente invención puede estar unido operativamente a un líder 5' no traducido heterólogo tal como uno que se deriva de un gen de proteína de choque térmico (véase por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N^{os} 5.659.122 y 5.362.865). De manera alternativa, un líder de la presente invención puede estar unido operativamente a un promotor heterólogo tal como el promotor 35S de transcripción del Virus del Mosaico de la Coliflor (véase, la Patente de EE. UU. N^o 5.352.605).

15 Como se utiliza en el presente documento, el término "intrón" se refiere a una molécula de ADN que se puede aislar o identificar a partir de la copia genómica de un gen y se puede definir generalmente como una región que se desprende durante el procesamiento del ARNm antes de la traducción. De manera alternativa, un intrón puede ser un elemento ADN que está producido sintéticamente o modificado. Un intrón puede contener elementos amplificadores que efectúan la transcripción de genes unidos operativamente. Un intrón se puede utilizar como un
20 elemento regulador para modificar la expresión de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que está unido operativamente. Una construcción de ADN puede comprender un intrón, y el intrón puede ser o no heterólogo con respecto a la secuencia de la molécula de polinucleótido que se puede transcribir. Ejemplos de intrones en la técnica incluyen el intrón de actina de arroz (Patente de EE. UU. N^o 5.641.876) y el intrón HSP70 de maíz (Patente de EE. UU. N^o 5.859.347).

25 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de terminación de la transcripción 3'" o "3' UTR" se refiere a una molécula de ADN que se utiliza durante la transcripción para producir la región no traducida 3' (3' UTR) de una molécula ARNm. La región no traducida 3' de una molécula de ARNm puede generarse por escisión específica y poliadenilación 3', cola poliA a.k.a. Una 3' UTR puede estar unida operativamente a y localizarse corriente abajo de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir y puede incluir polinucleótidos que
30 proporcionan una señal de poliadenilación y otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción, el procesamiento de ARNm, o la expresión genética. Se piensa que las colas poliA funcionan en la estabilidad del ARNm y en el inicio de la traducción. Ejemplos de moléculas 3' de terminación de la transcripción en la técnica son la región 3' de nopalina sintasa (véase, Fraley, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4803-4807 (1983)); región 3' de HSP de trigo; región 3' de la subunidad pequeña de la rubisco de guisante; región 3' E6 de algodón (Patente de EE. UU. 6.096.950); regiones 3' desveladas en el documento WO 0011200A2; y la 3' UTR de coixina (Patente de EE. UU. N^o 6.635.806).

Las construcciones y vectores también pueden incluir una secuencia codificante de un péptido de tránsito que expresa un péptido unido que es útil para dirigirse a un producto proteico, particularmente a un cloroplasto, leucoplasto, u otro orgánulo plasto; mitocondria; peroxisoma; vacuola; o una localización extracelular. Para las
40 descripciones del uso de péptidos de tránsito en cloroplastos, véase la Patente de EE. UU. N^o 5.188.642 y la Patente de EE. UU. N^o 5.728.925. Muchas proteínas localizadas en los cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares y precursores que se dirigen a los cloroplastos gracias a un péptido de tránsito de cloroplastos (CTP). Ejemplos de tales proteínas de cloroplastos aisladas incluyen las asociadas con la pequeña subunidad (SSU) de ribulosa-1,5, -bifosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidorreductasa, la proteína I y la proteína II del complejo de recolección lumínica, tiorresoxina F, enolpiruvil shikimato fosfato (EPSPS), y péptidos de tránsito descritos en la Patente de EE. UU. N^o 7.193.133. Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que las proteínas no cloroplásticas se pueden
45 dirigir a los cloroplastos por el uso de fusiones proteicas con CTP heterólogos y que el CTP es suficiente para dirigir una proteína al cloroplasto. Se ha demostrado que la incorporación de un péptido de tránsito al cloroplasto adecuado tal como el CTP EPSPS (CTP2) de *Arabidopsis thaliana* (véase, Klee y col., Mol. Gen. Genet., 210:437-442 (1987)) o el CTP EPSPS (CTP4) de *Petunia hybrida* (véase, della-Cioppa y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6873-6877 (1986)) dirige secuencias proteicas EPSPS heterólogas a los cloroplastos en plantas transgénicas (véase, las Patentes de EE. UU. N^{os} 5.627.061; 5.633.435; y 5.312.910 y documentos EP 0218571; EP 189707; EP 508909; y EP 924299).

Moléculas de polinucleótido que se puede transcribir

55 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de polinucleótido que se puede transcribir" se refiere a cualquier molécula de ADN capaz de transcribirse en una molécula de ARN, incluyendo las que tienen secuencias codificantes de proteínas y las que tienen secuencias útiles para la supresión genética. Un "transgén" se refiere a una molécula heteróloga de polinucleótido que se puede transcribir en una célula huésped y/o una molécula de polinucleótido que se puede transferir que se ha incorporado artificialmente al genoma de una célula huésped.

Un promotor de la presente invención puede estar unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que sea heteróloga con respecto a la molécula promotora. Como se utiliza en el presente documento, el término "heterólogo" se refiere a la combinación de dos o más moléculas de polinucleótido cuando tal combinación no se encontraría normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, las dos moléculas se pueden derivar de diferentes especies y/o las dos moléculas se pueden derivar de diferentes genes, por ejemplo, genes diferentes de la misma especie o los mismos genes de diferentes especies. Por lo tanto, un promotor es heterólogo con respecto a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que está unido operativamente si tal combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza, es decir, la molécula de polinucleótido que se puede transcribir no está en su origen natural unida operativamente en combinación con la molécula promotora.

La molécula de polinucleótido que se puede transcribir puede ser en general cualquier molécula de ADN cuya expresión es deseable. Tal expresión en un ARN transcrito puede dar como resultado la traducción de la molécula de ARNm resultante y por lo tanto la expresión proteica. De manera alternativa, una molécula de polinucleótido que se puede transcribir puede diseñarse para que en último término produzca la disminución de la expresión de un gen o proteína específica. Esto se puede conseguir utilizando una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que se oriente en la dirección antisentido. Un experto en la técnica está familiarizado con el uso de tal tecnología antisentido. En resumen, según se transcribe la molécula de polinucleótido que se puede transcribir, el producto de ARN se hibrida con y secuestra una molécula de ARN complementaria dentro de la célula. Cualquier gen se puede regular negativamente de esta manera.

Por lo tanto, una realización de la invención es un elemento regulador de la presente invención, tal como los que se proporcionan en las SEC ID N^o: 14, 15 y 17-20, que se une operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir de manera que se module la transcripción de la molécula de polinucleótido que se puede transcribir a un nivel deseado o en un patrón deseado con la introducción de dicha construcción en una célula vegetal. En una realización, la molécula de polinucleótido que se puede transcribir comprende una región codificante de proteína de un gen, y el promotor afecta la transcripción de una molécula de ARN que se traduce y se expresa en un producto proteico. En otra realización, la molécula de polinucleótido que se puede transcribir comprende una región antisentido de un gen, y el promotor afecta la transcripción de una molécula de ARN antisentido u otra molécula inhibidora de ARN similar con el fin de inhibir la expresión de una molécula específica de ARN de interés en una célula huésped diana.

Genes de interés agronómico

Las moléculas de polinucleótido que se pueden transcribir pueden ser genes de interés agronómico. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "gen de interés agronómico" se refiere a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que cuando se expresa en un tejido, célula o tipo celular vegetal particular proporciona una característica deseable que se asocia con la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo, rendimiento, producto, perfil nutricional, resistencia a la enfermedad o peste y/o tolerancia ambiental o química de la planta. Los genes de interés agronómico incluyen los que codifican una proteína de producción, una proteína de resistencia a la tensión, una proteína de control del desarrollo, una proteína de diferenciación tisular, una proteína del meristemo, una proteína ambientalmente sensible, una proteína de senescencia, una proteína sensible a hormonas, una proteína de abscisión, una proteína fuente, una proteína de fijación, una proteína de control de la floración, una proteína de semilla, una proteína de resistencia a herbicidas, una proteína de resistencia a enfermedades, una enzima biosintética de ácidos grasos, una enzima biosintética de tocoferol, una enzima biosintética de aminoácidos, una proteína pesticida, o cualquier otro agente tal como una molécula antisentido o ARNi que se dirige a un gen particular para su supresión. El producto de un gen de interés agronómico puede actuar en la planta con el fin de producir un efecto en la fisiología o metabolismo de la planta o puede actuar como agente pesticida en la dieta de una peste que se alimenta de la planta.

En una 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 que se puede transcribir que es un gen de interés agronómico. La expresión del gen de interés agronómico es deseable con el fin de conferir un rasgo agronómicamente beneficioso. Un rasgo agronómicamente beneficioso puede ser, por ejemplo, tolerancia a herbicidas, control de insectos, modificación del rendimiento, resistencia a enfermedades fúngicas, resistencia a virus, resistencia a nematodos, resistencia a enfermedades bacterianas, desarrollo y crecimiento de la planta, producción de almidón, producción de aceites modificados, alta producción de aceites, modificación del contenido en ácidos grasos, alta producción de proteínas, maduración de fruta, aumento de nutrición animal y humana, biopolímeros, resistencia a la tensión ambiental, péptidos farmacéuticos y péptidos que se pueden segregar, mejora de los tratamientos de procesamiento, mejora de la digestibilidad, producción de enzimas, fijación de nitrógeno, producción de semillas híbridas, producción de fibra, y producción de biocombustible. Ejemplos de genes de interés agronómico que se conocen en la técnica incluyen los de resistencia a herbicida (Patentes de EE. UU. N^{os} 6.803.501; 6.448.476; 6.248.876; 6.225.114; 6.107.549; 5.866.775; 5.804.425; 5.633.435; y 5.463.175), aumento del rendimiento (Patentes de EE. UU. N^{os} 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), control de insectos (Patentes de EE. UU. N^{os} 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. N^{os} 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. N^{os} 6.617.496; 6.608.241; 6.015.940; 6.013.864; 5.850.023; y 5.304.730), resistencia a nematodos (Patente de EE. UU. N^o 6.228.992), resistencia a enfermedad bacteriana (Patente de EE. UU. N^o 5.516.671), desarrollo y crecimiento de la planta (Patentes de EE. UU. N^{os} 6.723.897 y 6.518.488), producción de almidón (Patentes de EE. UU. N^{os} 6.538.181; 6.538.179; 6.538.178; 5.750.876; 6.476.295), producción de aceites modificados (Patentes de EE. UU. N^{os} 6.444.876; 6.426.447; y 6.380.462), alta producción de aceite (Patentes de EE. UU. N^{os} 6.495.739; 5.608.149; 6.483.008; y 6.476.295), modificación del contenido de ácidos grasos (Patentes de EE. UU. N^{os} 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), alta producción de proteínas (Patente de EE. UU. N^o 6.380.466), maduración de fruta (Patente de EE. UU. N^o 5.512.466), aumento de la nutrición animal y humana (Patentes de EE. UU. N^{os} 6.723.837; 6.653.530; 6.5412,59; 5,985,605; y 6,171,640), biopolímeros (Patentes de EE. UU. N^{os} USRE37.543; 6.228.623; y 5.958.745, y 6.946.588), resistencia a la tensión ambiental (Patente de EE. UU. N^o 6.072.103), péptidos farmacéuticos y péptidos que se pueden segregar (Patentes de EE. UU. N^{os} 6.812.379; 6.774.283; 6.140.075; y 6.080.560), mejora de los tratamientos de procesamiento (Patente de EE. UU. N^o 6.476.295), mejora de la digestibilidad (Patente de EE. UU. N^o 6.531.648), baja rafinosa (Patente de EE. UU. N^o 6.166.292), producción industrial de enzimas (Patente de EE. UU. N^o 5.543.576), mejora del sabor (Patente de EE. UU. N^o 6.011.199), fijación de nitrógeno (Patente de EE. UU. N^o 5.229.114), producción de semillas (Patente de EE. UU. N^o 5.689.041), producción de fibra (Patentes de EE. UU. N^{os} 6.576.818; 6.271.443; 5.981.834; y 5.869.720) y producción de biocombustible (Patente de EE. UU. N^o 5.998.700).

De manera alternativa, un gen de interés agronómico puede afectar las características o fenotipo de la planta que se mencionan anteriormente codificando un molécula de ARN que produce la modulación dirigida de la expresión genética de un gen endógeno, por ejemplo, por la vía antisentido (véase por ejemplo, la Patente de EE. UU. 5.107.065); ARN inhibidor ("ARNi", que incluye la modulación de la expresión genética por medio de mecanismos mediados por miARN, siARN, siARN que actúa como trans, y sARN en fase, por ejemplo, como se describen en las publicaciones de solicitudes US 2006/0200878, US 2008/0066206, y US2009/0070898; o mecanismos mediados por co-supresión. El ARN podría ser también una molécula de ARN catalítica (por ejemplo, una ribozima o un ribointerruptor; véase, por ejemplo, el documento US 2006/0200878) que se modifica para escindir el producto de ARNm endógeno que se desee. Por lo tanto, cualquier molécula de polinucleótido que se puede transcribir que codifique una molécula transcrita de ARN que afecta un fenotipo agronómicamente importante o cambio morfológico de interés, puede ser útil para la práctica de la presente invención. Se conocen procedimientos en la técnica para la construcción e introducción de construcciones en una célula de tal manera que la molécula de polinucleótido que se puede transcribir se transcriba en una molécula que sea capaz de producir la supresión genética. Por ejemplo, se desvela la supresión genética post-transcripcional que utiliza una construcción con una molécula de polinucleótido que se puede transcribir orientada anti-sentido para regular la expresión genética en células vegetales en las Patentes de EE. UU. N^{os} 5.107.065 y 5.759.829, y se desvela la supresión post-transcripcional utilizando una construcción con una molécula de polinucleótido que se puede transcribir orientada anti-sentido para regular la expresión genética en plantas en las Patentes de EE. UU. N^{os} 5.283.184 y 5.231.020. La expresión de un polinucleótido que se puede transcribir en una célula vegetal también se puede utilizar para suprimir las plagas de las plantas que se alimentan de la célula vegetal, por ejemplo, composiciones aisladas de plagas por coleópteros (Publicación de Patente de EE. UU. N^o US2007/0124836) y composiciones aisladas de plagas por nematodos (Publicación de Patente de EE. UU. N^o US2007/0250947). Las plagas de las plantas incluyen las plagas por artrópodos, plagas por nematodos, y plagas fúngicas y microbianas. Las moléculas de polinucleótido que se pueden transcribir para la incorporación en construcciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN o genes de especies distintas a las especies diana o genes que se originan con o están presentes en la misma especie, pero que se incorporan en células receptoras por procedimientos de modificación genética más que por técnicas de cruce y reproducción clásicas. El tipo de la molécula de polinucleótido puede incluir una molécula de polinucleótido que 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, tal como una molécula de polinucleótido que contiene un mensaje antisentido de un gen, o una molécula de polinucleótido que codifica un transgén artificial, sintético, o versión modificada de otra manera.

Marcadores genéticos

Como se utiliza en el presente documento el término "marcador" se refiere a cualquier molécula de polinucleótido que se puede transcribir cuya expresión, o la falta de la misma, se puede explorar o valorar de alguna manera. Los genes marcadores para su uso en la práctica de la presente invención incluyen moléculas de polinucleótido que se puede transcribir que codifican la β -glucuronidasa (GUS descrita en la Patente de EE. UU. N^o 5.599.670), proteína fluorescente verde, y variantes de la misma (GFP descrita en las Patentes de EE. UU. N^{os} 5.491.084 y 6.146.826), proteínas que confieren resistencia a antibióticos, o proteínas que confieren tolerancia a herbicidas. Los marcadores útiles de resistencia a antibióticos, que incluyen los que codifican proteínas que confieren resistencia a la kanamicina (*nptII*), higromicina B (*aph IV*), estreptomina o espectinomina (*aad*, *espec/estrep*) y gentamicina (*aac3* y *aacC4*) se conocen en la técnica. Los herbicidas a los cuales se ha demostrado la tolerancia en plantas transgénicas y a los que se puede aplicar el procedimiento de la presente invención, incluyen: herbicidas de ácido amino-metil-fosfónico, glifosato, glufosinato, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinil, dalapon, dicamba, ciclohexanodiona, inhibidores de

la toporfinirógeno oxidasa, y isoxaflutol. Las moléculas de polinucleótido que se puede transcribir que codifican proteínas implicadas en la tolerancia a herbicidas se conocen en la técnica, e incluyen una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que codifica la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS para la tolerancia al glifosato descrita en la Patente de EE. UU. N^{os} 5.627.061; 5.633.435; 6.040.497; y 5.094.945); una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que codifica una oxidorreductasa y glifosato-N-acetil transferasa (GOX descrita en la Patente de EE. UU. N^o 5.463.175; GAT descrita en la Publicación de Patente de EE. UU. N^o 2003/0083480, y dicamba monooxigenasa en la Publicación de Patente de EE. UU. N^o 2003/0135879); una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que codifica la bromoxinil nitrilasa (*Bxn* para tolerancia al Bromoxinilo descrita en la Patente de EE. UU. N^o 4.810.648); una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que codifica la fitoeno desaturasa (*crtI*) descrita en Misawa, y col., *Plant Journal*, 4:833-840 (1993) y Misawa, y col., *Plant Journal*, 6:481-489 (1994) para la tolerancia a la norflurazona; una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que codifica la acetohidroxiácido sintasa (AHAS, *aka* ALS) descrita en Sathasiivan, y col., *Nucl. Acids Res.*, 18:2188-2193 (1990) para la tolerancia a los herbicidas sulfonilurea; y el gen *bar* descrito en DeBlock, y col., *EMBO Journal*, 6:2513-2519 (1987) para la tolerancia a glufosinato y bialafós. Las moléculas promotoras de la presente invención pueden expresar moléculas de polinucleótido que se pueden transcribir unidas que codifican fosfinotricina acetiltransferasa, resistencia a glifosato EPSPS, aminoglucósido fosfotransferasa, hidroxifenil piruvato deshidrogenasa, higromicina fosfotransferasa, neomicina fosfotransferasa, dalapon deshalogenasa, nitrilasa resistente a bromoxinil, antranilato sintasa, ariloxialcanoato dioxigenasas, acetilCoA carboxilasa, glifosato oxidorreductasa, y glifosato-N-acetil transferasa.

También se incluyen en la expresión "marcadores genéticos" los genes que codifican un marcador genético cuya secreción se puede detectar como un medio para identificar o seleccionar las células transformadas. Los ejemplos incluyen marcadores que codifican un antígeno segregable que se puede identificar por su interacción con anticuerpos, o incluso enzimas segregables que se pueden detectar catalíticamente. Las proteínas marcadores segregadas que se pueden seleccionar se encuentran en varias clases, que incluyen proteínas pequeñas que se pueden difundir que son detectables (por ejemplo, por ELISA), pequeñas enzimas activas que son detectables en una solución extracelular (por ejemplo, alfa-amilasa, beta-lactamasa, fosfinotricina transferasa), o proteínas que están insertadas o atrapadas en la pared celular (tal como proteínas que incluyen una secuencia líder tal como la que se encuentra en la unidad de expresión de extensión o proteínas relacionadas con la patogénesis en el tabaco también conocidas como PR-S del tabaco). Otros posibles genes marcadores genéticos serán evidentes para los expertos en la técnica y están englobados en la presente invención.

Transformación celular

La invención también se refiere a un procedimiento para producir células transformadas y plantas que comprenden un promotor unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir.

El término "transformación" se refiere a la introducción de un ácido nucleico en un huésped receptor. Como se utiliza en el presente documento, el término "huésped" se refiere a bacterias, hongos, o plantas, que incluyen cualquier célula, tejido, órgano o progenie de la bacteria, hongo o planta. Los tejidos y células vegetales de particular interés incluyen protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, plántulas, embriones, y polen.

Como se utiliza en el presente documento, el término "transformado" se refiere a una célula, tejido, órgano u organismo en el cual se ha introducido una molécula de polinucleótido ajena, tal como una construcción. La molécula de polinucleótido que se introduce puede integrarse en el ADN genómico de la célula, tejido, órgano u organismo receptor tal que la molécula de polinucleótido que se introduce es heredada por la progenie posterior. Una célula u organismo "transgénico" o "transformado" también incluye la progenie de la célula u organismo y la progenie producida a partir de un programa de cruces que emplean tal organismo transgénico como un parental en un cruce y que muestra un fenotipo alterado que resulta de la presencia de una molécula de polinucleótido ajena. El término "transgénico" se refiere a una bacteria, hongo o planta que contiene una o más moléculas de ácido polinucleico heterólogo.

Hay muchos procedimientos para introducir moléculas de ácido polinucleico en células vegetales. El procedimiento en general comprende las etapas de selección de una célula huésped adecuada, la transformación de la célula huésped con un vector recombinante, y obtener la célula huésped transformada. Los procedimientos adecuados incluyen la infección bacteriana (por ejemplo, con *Agrobacterium*), vectores cromosómicos artificiales bacterianos binarios, suministro directo de ADN (por ejemplo, por medio de transformación mediada por PEG, captación de ADN mediada por desecación/inhibición, electroporación, agitado con fibras de carburo de silicio, y aceleración de partículas revestidas de ADN, etc. (revisado en Potrykus, y col., *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. Los procedimientos y materiales para la transformación de células vegetales introduciendo una construcción de ADN vegetal en el genoma vegetal en la práctica de la presente invención, pueden incluir cualquiera de los procedimientos bien conocidos y demostrados que incluyen:

(1) procedimientos químicos (Graham y Van der Eb, *Virology*, 54:536-539 (1973) y Zatloukal, y col., *Ann. N.Y.*

Acad. Sci., 660:136-153 (1992));

(2) procedimientos físicos tal como microinyección (Capecchi, Cell, 22:479-488 (1980)), electroporación (Wong y Neumann, Biochim. Biophys. Res. Commun., 107:584-587 (1982); Fromm, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5824-5828 (1985); Patente de EE. UU. N° 5.384.253), aceleración de partículas (Johnston y Tang, Methods Cell Biol., 43(A):353-365 (1994); Fynan, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11478-11482 (1993)), y bombardeo de microproyectiles (como se ilustra en las Patentes de EE. UU. N°s 5.015.580; 5.550.318; 5.538.880; 6.160.208; 6.399.861; y 6.403.865);

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

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

(5) mecanismos mediados por bacterias tales como la transformación mediada por *Agrobacterium* (como se ilustra en las Patentes de EE. UU. N°s 5.824.877; 5.591.616; 5.981.840; y 6.384.301);

(6) introducción directa en el polen inyectándolo en órganos reproductivos de las plantas (Zhou, y col., Methods in Enzymology, 101:433, (1983); Hess, Intern Rev. Cytol., 107:367 (1987); Luo, y col., Plant Mol Biol. Reporter, 6:165 (1988); Pena, y col., Nature, 325:274 (1987));

(7) transformación de protoplastos (como se ilustra en la Patente de EE. UU. N° 5.508.184); e

(8) inyección en embriones maduros (Neuhaus, y col., Theor. Appl. Genet., 75:30 (1987)).

Cualquiera de los procedimientos que se han descrito anteriormente se puede utilizar para transformar una célula huésped con uno o más promotores y/o construcciones de la presente invención. Las células huésped pueden ser cualquier célula u organismo tal como una célula vegetal, célula de alga, célula fúngica, hongo, célula bacteriana, o célula de insecto. Los huéspedes y células transformadas preferidos incluyen las células de: plantas, *Aspergillus*, levaduras, insectos, bacterias y algas.

Se han publicado procedimientos para la transformación de plantas dicotiledóneas, primariamente por el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y la obtención de plantas transgénicas de algodón (Patentes de EE. UU. N°s 5.004.863; 5.159.135; y 5.518.908); soja (Patentes de EE. UU. N°s 5.569.834 y 5.416.011; véase también, McCabe, y col., Biotechnology, 6:923 (1988) y Christou y col., Plant Physiol. 87:671-674 (1988)); género Brassica (Patente de EE. UU. N° 5.463.174); cacahuete (Cheng y col., Plant Cell Rep., 15:653-657 (1996) y McKently y col., Plant Cell Rep., 14:699-703 (1995)); papaya; y guisante (Grant y col., Plant Cell Rep., 15:254-258 (1995)).

También se han comunicado transformaciones en plantas monocotiledóneas utilizando electroporación, bombardeo de partículas, y *Agrobacterium*. La transformación y regeneración de plantas se ha conseguido en el espárrago (Bytebier, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84:5354 (1987); cebada (Wan y Lemaux, Plant Physiol, 104:37 (1994)); maíz (Rhodes, y col., Science 240:204 (1988), Gordon-Kamm, y col., Plant Cell, 2:603-618 (1990), Fromm, y col., Bio/Technology, 8:833 (1990), Koziel y col., Bio/Technology, 11:194 (1993), y Armstrong, y col., Crop Science, 35:550-557 (1995)); avena (Somers, y col., Bio/Technology, 10:1589 (1992)); pasto ovillo (Horn, y col., Plant Cell Rep., 7:469 (1988)); centeno (De la Pena, y col., Nature, 325:274 (1987)); caña de azúcar (Bower y Birch, Plant Journal, 2:409 (1992)); festuca alta (Wang, y col., Bio/Technology, 10:691 (1992)); y trigo (Vasil, y col., Bio/Technology, 10:667 (1992) y Patente de EE. UU. N° 5.631.152).

La regeneración, desarrollo y cultivo de plantas a partir de protoplastos vegetales o explantas transformadas se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Weissbach y Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, (Eds.), Academic Press, Inc., San Diego, CA (1988) y Horsch y col., Science, 227:1229-1231 (1985)). Las células transformadas se cultivan generalmente en presencia de un medio selectivo, que selecciona las células transformadas satisfactoriamente e induce la regeneración de brotes y raíces en plantas intactas (Fraleley, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 4803 (1983)). Las plantas transformadas se obtienen típicamente en dos a cuatro meses.

Las plantas transgénicas regeneradas se auto-polinizan para producir plantas transgénicas homocigotas. De manera alternativa, el polen que se obtiene de las plantas transgénicas regeneradas se puede cruzar con plantas no transgénicas, preferentemente en líneas endogámicas de especies agrónomicamente importantes. Las descripciones de los procedimientos de cruce que se utilizan comúnmente para diferentes rasgos y cultivos se pueden encontrar en uno de varios libros 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, Longnaan, Inc., NY, 369-399 (1979); Snee y Hendriksen, Plant breeding perspectives, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, Soybeans: Improvement, Production and Uses, 2ª Edición, Monograph., 16:249 (1987); Fehr, Principles of variety development, Theory and Technique, (Vol 1) y Crop Species Soybean (Vol 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987). Por el contrario, el polen de las plantas no transgénicas puede utilizarse para polinizar las plantas transgénicas regeneradas.

Las plantas transformadas se pueden analizar por la presencia de los genes de interés y el nivel de expresión y/o perfil conferido por los elementos reguladores de la presente invención. Los expertos en la técnica están al tanto de los numerosos procedimientos disponibles para el análisis de plantas transformadas. Por ejemplo, los procedimientos para el análisis de plantas incluyen transferencias de Southern o trasferencias de Northern, estrategias basadas en PCR, análisis bioquímicos, procedimientos de exploración fenotípica, evaluaciones de

campo, y ensayos inmunodiagnósticos. La expresión de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir se puede medir utilizando reactivos y procedimientos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) como se describe por el fabricante y tiempos de ciclo de PCR que se determinan utilizando la TaqMan® Testing Matrix. De manera alternativa, se pueden utilizar los reactivos y procedimientos del Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) como describe el fabricante para la expresión transgénica.

Las semillas de las plantas de la presente invención se pueden recolectar a partir de plantas transgénicas fértiles y se pueden utilizar 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.

La presente invención también proporciona partes de las plantas de la presente invención. Las partes de plantas sin limitación, incluyen hojas, tallos, raíces, tubérculos, endospermos, 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 junto con la molécula de polinucleótido transgénico a su progenie. La progenie incluye cualquier parte que se pueda regenerar o semilla de la planta que comprende el transgén derivado de una planta ancestro. La planta transgénica es preferentemente homocigota para la molécula de polinucleótido transformada y transmite esta secuencia a toda la descendencia como resultado de reproducción sexual. La progenie se puede cultivar a partir de semillas producidas por la planta transgénica. Estas plantas adicionales pueden entonces auto-polinizarse para generar una línea de plantas por cruce verdadero. La progenie de estas plantas se evalúa, entre otras cosas, por la expresión genética. La expresión genética se puede detectar por varios procedimientos comunes tales como transferencia de western, transferencia de Northern, inmuno-precipitación, y ELISA.

Habiendo ya descrito la invención en general, la misma se entenderá más fácilmente por la referencia a los ejemplos siguientes. Los ejemplos que no están cubiertos por el ámbito de las reivindicaciones son con fines ilustrativos.

Ejemplos

Se aislaron elementos reguladores útiles para dirigir la expresión de un polinucleótido que se puede transcribir en plantas transgénicas, y se analizó el patrón de expresión de estos elementos reguladores unidos operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir en plantas transgénicas de maíz.

Ejemplo 1: Identificación y clonación de elementos reguladores

Se identificaron nuevos elementos reguladores y se asilaron a partir del ADN genómico de la especie monocotiledónea, mijo silvestre (*Setaria italica* (L.) Beauv). Se utilizó la secuencia EST para diseñar los cebadores, los cuales se utilizaron entonces con las bibliotecas construidas con el GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 5' de la secuencia de ADN genómico correspondiente. Esta región clonada contenía la secuencia 5' UTR corriente arriba de la región codificante de proteína para cada gen de *S. italica*. Utilizando esta secuencia, se identificaron bioinformáticamente los elementos reguladores en la 5' UTR de cada gen. Se utilizó el análisis bioinformático para identificar el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y cualquiera de las secuencias codificantes bi-direccionalmente, intrones, o corriente arriba presentes en la secuencia. Utilizando los resultados de estos análisis, se definieron los elementos reguladores en la secuencia 5' UTR. Los cebadores se diseñaron para amplificar los elementos reguladores. La molécula de ADN correspondiente para cada elemento regulador se amplificó utilizando las condiciones convencionales de la reacción en cadena de polimerasa con cebadores que contienen sitios de enzima de restricción únicos y el ADN genómico aislado de *S. italica*. Los fragmentos de ADN resultantes se unieron en un vector básico de expresión en plantas utilizando la digestión convencional por enzimas de restricción. Los vectores de expresión en plantas resultantes contenían una región de borde derecho de *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.borde derecho), elemento(s) regulador de ensayo unido operativamente a un intrón derivado de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays*, ligado operativamente a una secuencia codificante para β-glucuronidasa (GUS), ligada operativamente a la región de terminación 3' de Nopalina sintasa de *A. tumefaciens*, y una región de borde izquierdo de *A. tumefaciens* (B-AGRtu.borde izquierdo).

Las secuencias de los elementos reguladores se proporcionan en el presente documento como las SEC ID N°: 1-20 y se enumeran en la Tabla 1 posteriormente. Las secuencias promotoras se proporcionan en el presente documento como las SEC ID N°: 3, 6, 11, y 16. Las secuencias que se proporcionan en el presente documento como las SEC ID N°: 1, 4, 7, 9, 12, 14, 17, y 19 son de un promotor unido operativamente y una secuencia líder.

Tabla 1: Elementos reguladores.

SEC ID	Notación	Notación de ADNc
1	EXP-SETit.TIP	Proteína Intrínseca del Tonoplasto
2	P-SETit.Tip-1:1:1	Proteína Intrínseca del Tonoplasto

(continuación)

SEC ID	Notación	Notación de ADNc
3	L-SETit.Tip-1:1:1	Proteína Intrínseca del Tonoplasto
4	EXP-SETit.Mtha	Proteína tipo Metalotioneína
5	P-SETit.Mtha-1:1:1	Proteína tipo Metalotioneína
6	L-SETit.Mth-1:1:1	Proteína tipo Metalotioneína
7	EXP-SETit.Mthb	Proteína tipo Metalotioneína
8	P-SETit.Mthb-1:1:2	Proteína tipo 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-1:1:2	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-SETit.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-SETit.Rcc3-1:1:11	Proteína de transferencia de lípidos

El elemento de expresión, EXP-SETit.TIP (SEC ID N° 1) está compuesto por el promotor P-SETit.Tip-1:1:1 (SEC ID N° 2) y el 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 de promotor (Figura 1). Una versión P-SETit.Rcc3-1:1:1 de 2062 nucleótidos (SEC ID N° 15); una versión P-SETit.Rcc3-1:1:10 de 1563 nucleótidos (SEC ID N° 18); y una versión P-SETit.Rcc3-1:1:11 de 915 nucleótidos (SEC ID N° 20). El elemento de expresión, EXPSETit.Rcc3-1 (SEC ID N° 14) está compuesto por el promotor P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEC ID N° 15) y el líder PSETit.Rcc3-1:1:2 (SEC ID N° 16). El elemento de expresión, EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17) está compuesto por el promotor P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEC ID N° 18) y el líder L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEC ID N° 16). El elemento de expresión, EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19) está compuesto por el promotor P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEC ID N° 20) y el líder P-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEC ID N° 16).

- 15 Para los elementos reguladores del gen de la proteína tipo Metalotioneína, se diseñaron dos variantes de promotor (Figura 2). Una versión P-SETit.Mtha-1:1:1 que es más corta con 483 nucleótidos; una versión P-SETit.Mthb-1:1:2 de esta que es más larga con 1516 nucleótidos. El elemento de expresión, EXP-SETit.Mtha (SEC ID N° 4) está compuesto por el promotor P-SETit.Mtha-1:1:1 (SEC ID N° 5) y el líder L-SETit.Mth-1:1:1 (SEC ID N° 6). El elemento de expresión, EXP-SETit.Mthb (SEC ID N° 7) está compuesto por el promotor P-SETit.Mthb-1:1:2 (SEC ID N° 8) y el líder L-SETit.Mth-1:1:1 (SEC ID N° 5).

- 20 Para los elementos reguladores del gen de la proteína relacionada con la deshidratación, se aislaron elementos reguladores de dos variantes alélicas (Figuras 3A y 3B). Las dos variantes alélicas tienen secuencias líderes idénticas, pero las secuencias promotoras son variantes con varios cambios e inserciones/eliminaciones de bases cuando se alineaban. El elemento de expresión, EXPSETit.DRPa (SEC ID N° 9) está compuesto por el promotor P-SETit.DRP-1:1:1 (SEC ID N° 10) y el líder L-SETit.DRP-1:1:2 (SEC ID N° 11). El elemento de expresión, EXP-SETit.DRPb (SEC ID N° 12) está compuesto por el promotor PSETit.DRPb-1:1:1 (SEC ID N° 13) y el líder L-SETit.DRP-1:1:2 (SEC ID N° 11).

Ejemplo 2: Análisis de elementos reguladores que dirigen la GUS en maíz transgénico

Se transformaron plantas de maíz con vectores de expresión en plantas que contenían elementos reguladores de ensayo que dirigían la expresión del transgén de la β -glucuronidasa (GUS), y se analizaron las plantas resultantes por la expresión de proteína GUS.

- 30 Las plantas de maíz se transformaron con construcciones de expresión de GUS, 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 que se conocen por los expertos en la técnica y embriones zigóticos inmaduros H99 para producir plantas de maíz transgénico. En resumen se recolectaron mazorcas de plantas de maíz H99 10-13 días tras la polinización a partir de plantas cultivadas en invernadero y esterilizadas. Los embriones zigóticos inmaduros de 1,2-1,5 mm se escindieron de la mazorca y se incubaron a 28 ° Celsius en oscuridad durante 3-5 días antes del su uso como tejido diana para el bombardeo. El vector de transformación en plantas que contenía el marcador genético de resistencia a kanamicina (gen NPTII) y el

casete de expresión GUS se digirió con endonucleasas de restricción. Se purificó en gel un único fragmento de ADN que contenía el marcador genético y el casete GUS y se utilizó para revestir partículas de oro de 0,6 micrómetros (nº de catálogo 165-2262 Bio-Rad, Hercules, CA) para el bombardeo. Se cargaron macro-portadores con las partículas de oro revestidas de ADN (nº de catálogo 165-2335 Bio-Rad, Hercules CA). Los embriones se transfirieron a un medio osmótico, con el scutellum en el lado de arriba. Se utilizó un arma biolística PDS 1000/Hc para la transformación (nº de catálogo 165-2257 Bio-Rad, Hercules CA). Los embriones inmaduros que se bombardearon se cultivaron y se seleccionaron los callos transgénicos y se transfirieron a un medio de regeneración tisular. Las plantas de maíz transgénico se regeneraron a partir de los callos transgénicos y se transfirieron al invernadero.

Se utilizó un análisis histoquímico para el análisis cualitativo de la expresión de plantas transformadas. Todas las secciones tisulares se incubaron con solución X-Gluc de tinción de GUS (5-bromo-4-cloro-indolil-b-glucuronido) (1 miligramo/mililitro) durante un tiempo apropiado, se aclararon, y se inspeccionaron visualmente por su coloración azul. La actividad de GUS se determinaba cualitativamente por inspección visual directa o inspección bajo el microscopio utilizando órganos y tejidos vegetales seleccionados. Las plantas R₀ se inspeccionan por la expresión en raíces y hojas. Los elementos reguladores EXP-SETit.TIP (SEC ID Nº 1), EXP-SETit.Mtha (SEC ID Nº 4), y EXP-SETit.DRPa (SEC ID Nº 9) demostraban la expresión de GUS tanto en raíces como en hojas en las transformantes R₀.

Las plantas transformadas con la expresión de GUS dirigida por EXP-SETit.TIP (SEC ID Nº 1) o EXP-SETit.Mtha (SEC ID Nº 4) se cruzaron con plantas H99 no transformadas para producir una población F₁ de transformantes. Los niveles de expresión de GUS se midieron en tejidos seleccionados durante el curso del desarrollo. Los tejidos de F₁ que se utilizaron para este estudio incluían: embriones de semillas embebidas, endospermo de semillas embebidas, raíces (de 3 días tras la germinación), coleoptilos (3 días tras la germinación), V3 raíz principal y corona, V3 hoja, V7 raíz seminal y de corona, V7 hoja madura, VT (en la formación de panojas, antes de la reproducción) raíz seminal, VT intermodal, VT mazorca, VT antera, VT polen, VT seda, granos 7 días tras la polinización, embrión 21 días tras la polinización, endospermo 21 días tras la polinización, embrión 35 días tras la polinización, endospermo 35 días tras la polinización. La expresión de GUS en la F₁ se veía en todos los tejidos estudiados en ambos de los eventos transformados EXP-SETit.TIP (SEC ID Nº 1) y EXP-SETit.Mtha (SEC ID Nº 4).

Ejemplo 3: Análisis de los elementos reguladores que dirigen la TIC809 en maíz transgénico

Las plantas de maíz se transformaron con vectores de expresión en plantas que contenían los elementos reguladores de ensayo que dirigían la expresión del transgén TIC809, y las plantas resultantes se analizaron por la expresión de la proteína TIC809.

Los elementos reguladores estaban unidos operativamente al transgén de toxina de insecto, TIC809 (documento PCT US 2006/033867) en vectores de transformación de plantas. El casete del transgén estaba compuesto por elementos reguladores unidos operativamente a un intrón derivado de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays*, unido operativamente al transgén TIC809, unido operativamente a una 3' UTR derivada del gen HSP17 de *Triticum aestivum* L.. Los vectores de transformación de plantas también contenían un marcador genético de tolerancia a glifosato para la selección de las células vegetales transformadas.

El tejido de maíz de la variedad LH244 se transformó utilizando la transformación mediada por *A. tumefaciens* con los plásmidos, pMON70539 (EXP-SETit.TIP, SEC ID Nº 1), pMON70540 (EXP-SETit.Mtha, SEC ID Nº 4), y pMON70538 (EXPSETit.DRPa, SEC ID Nº 9) utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Las plantas R₀ se regeneraron a partir del tejido de maíz transformado y se ensayaron para confirmar la presencia e integridad del transgén TIC809. Las hojas y raíces de estas plantas se analizaron en el estadio V4 o V6 utilizando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas TIC809 (ELISA) para determinar los niveles de acumulación de proteína TIC809. Los valores de la proteína se determinaron utilizando una muestra TIC809 de referencia y se expresa en unidades de partes por millón (ppm). Los datos del ELISA se presentan en la Tabla 2 siguiente en la que "N" indica el número de plantas cruzadas.

Tabla 2: Datos del ELISA de TIC809 R₀

Nombre del elemento	SEC ID Nº	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

Se apreciaba la expresión de TIC809, dirigida por los elementos de expresión, EXP-SETit.TIP (SEC ID Nº 1), EXP-SETit.Mtha (SEC ID Nº 4), y EXP-SETit.DRPa (SEC ID Nº 9) tanto en raíces como en hojas, demostrando la capacidad de los elementos reguladores EXP-SETit.TIP, EXP-SETit.Mtha, y EXP-SETit.DRPa para modular la transcripción de un transgén de interés agronómico en plantas al que están unidos operativamente. La media de expresión de TIC809 dirigida por EXP-SETit.TIP (SEC ID Nº 1), EXP-SETit.Mtha (SEC ID Nº 4), y EXP-SETit.DRPa (SEC ID Nº 9) era al menos 2 veces o mayor en la hoja con respecto a la raíz en las tres construcciones.

Las plantas R0 transformadas que contenían 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 variedades LH59, utilizando la LH59 como la planta hembra y la LH244 como macho, para producir poblaciones F₁ transformadas. Para las plantas que contenían EXP-SETit.TIP (SEC ID N° 1) y EXP-SETit.Mtha (SEC ID N° 4), los niveles de proteínas TIC809 se medían entonces utilizando el ELISA en las hojas de la F₁ en los estadios V3, V7, y VT; en las raíces en los estadios V3 y V7; en los tejidos reproductores alrededor del estadio VT (anteras, polen y seda); y en la semilla o grano en desarrollo. Los resultados del ELISA se expresan en partes por millón (ppm) con las mediciones del error estándar que se indica como "SE" y se presentan en la Tabla 3 posteriormente. Para las plantas que contienen EXP-SETit.DRPa (SEC ID N° 9), se midieron los niveles de proteína TIC809 en las raíces utilizando el ELISA con tejidos tomados en el estadio V9. Los resultados del ELISA se expresan en partes por millón (ppm) y se presentan en la Tabla 4 posteriormente.

Tabla 3: Datos del ELISA TIC809 F₁ 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	0,31	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

Los niveles medios de expresión de proteína TIC809 dirigidos por los elementos reguladores EXP-SETit.TIP SEC ID N° 1) y EXP-SETit.Mtha (SEC ID N° 4) en las poblaciones F₁ eran consistentes con los niveles de expresión que se observan en las R0 transformadas, lo que confirma la capacidad de los elementos reguladores TIP y Mtha para dirigir la expresión de un transgén al que están unidos operativamente. El EXP-SETit.TIP (SEC ID N° 1) parece que tiene su máximo nivel de expresión en V3 en las raíces y hojas, con un declive de la expresión en el estadio V7 y bajo en los tejidos reproductivos y semillas en desarrollo. El EXP-SETit.Mtha (SEC ID N° 4) muestra una expresión consistente de TIC809 en las raíces y hojas entre el estadio V3 y V7, con declive de la expresión en las hojas en estadio V7, con menor expresión en tejidos reproductivos, y sin expresión en la semilla en desarrollo.

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

Tejidos del cruce F ₁	ppm
LII59/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
Expresión media de TIC809	1,19
Error estándar	0,79

Los niveles de expresión media de proteína TIC809 dirigida por el elemento regulador EXP-SETit.DRPa (SEC ID N° 9) en las raíces de la población F1 eran consistentes con los niveles de expresión que se observada en la R₀ transformada, confirmando la capacidad de los elementos reguladores DRPa para proporcionar la expresión en la raíz de un transgén al que están unidos operativamente.

Las poblaciones R₀ de las plantas transformadas con pMON120408 (EXP-SETit.Rcc3-1, SEC ID N° 14), pMON120407 (EXP-SETit.Rcc3-10, SEC ID N° 17), y pMON120410 (EXP-SETit.Rcc3-11, SEC ID N° 19) se produjeron como se ha descrito anteriormente. Los niveles de proteína TIC809 en estas plantas se midieron en hojas y raíces utilizando un ELISA en el tejido tomado en el estadio V4 o V6. Los resultados del ELISA se expresan en partes por millón (ppm) y se presentan en la Tabla 5 posterior.

Tabla 5: Datos del ELISA de TIC809 de R₀ para EXP-SETit.Rcc3-1, EXP-SETit.Rcc3-10, y EXP-SETit.Rcc3-11.

Nombre del elemento	Evento	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
EXP-SETit.Rcc3-1 (SEC ID N° 14)	Media	1,42	0
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
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
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
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-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	18	2,158	0
EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19)	Media	2,47	0

La expresión de TIC809 cuando se dirige por las variantes 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. La expresión baja o no expresión en las hojas se observaba en las tres variantes SETit.Rcc3 con la excepción de tres eventos transformados en los que la variante de elemento de expresión EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17) mostraba un bajo nivel de expresión de TIC809 en las hojas. La expresión media en las raíces de la proteína TIC809 era mayor utilizando la variante de elemento de expresión EXP-SETit.Rcc3-11 (SEC ID N° 19) que con las variantes EXP-SETit.Rcc3-1(SEC ID N° 14) y EXP-SETit.Rcc3-10 (SEC ID N° 17), pero los tres proporcionaban la expresión del transgén al que se unen operativamente en la raíz.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Monsanto Technology LLC

15 <120> ELEMENTOS REGULADORES EN PLANTAS Y SUS USOS

<130> MONS:222EP

ES 2 562 908 T3

<150> EP 09729204.9
 <151> 30-03-2009

5 <150> US 61/042957
 <151> 07-04-2008

<160> 20

10 <210> 1
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

15 <400> 1

```

tgtactgtca tattgtcgtg gtttttcaat tgctgtacct gatgcaaacg taatggggtt 60
actaatcttg caccgcgagg cttcaaaatg aagagtgcta atttgggtcca cgtcaccatc 120
accggttcga actgtctaga atggcaggca aagatgattg gacaggcatg cagggaaaaa 180
gagcaccggt gacgatgtat gcgagttccc accattgcga gcaatgatta tcagccacac 240
gacttactct tcagagctaa ccaactgccat gcagagaaaa agtgaatcat attgtcatga 300
tctacaacga agtgaacaa tcaggcatgc taaagtgctg aaactttact gatctctcat 360
gttggacaac aaagaatagc ggaatacatc agcaacgcaa ctcttgagct ttgcttgccg 420
aatgaccagc tagaatttcc aagcatttac agaaacatga ctttaagttt cagaaaaaca 480
aatacaaggc cactaaataa gcgtggggat aacatatacct ccagatgaca ggcaatctgc 540
aacttgacgc cattcaaagc tacgattaac aaaatattta agcgccacat gagataatat 600
atcctccaat tagggccttt agtattgtca ttagctcata accatggtgc atcctcacat 660
ggacgctgca taagaagttc ataatagcaa cagacatagc aacaaagcat ggtgcgcctg 720
cccggccgga ctagctagta ctaccaatca tggaataagc tagtacccta aatgaaatta 780
aaatgggttt tagcgattat ccacgccgctc cagaatactc taatccacaa gttgaggccg 840
cccataaagc cgcgagaggg cgacgccatg tgtataaaag gggcctaagc tgagtggact 900
tgctgcatca gattagtaag caatctcaag cgcagagagc caaagctttc ggtgtagctc 960
gaagagcaaa gcgaaggcaa g 981
    
```

20 <210> 2
 <211> 917
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

25 <400> 2

ES 2 562 908 T3

tgtactgtca tattgtcgtg gtttttcaat tgctgtacct gatgcaaacg taatgggttt 60
 actaatcttg caccgccgg cttcaaatg aagagtgcta atttgggtcca cgtcaccatc 120
 accggttcga actgtctaga atggcaggca aagatgattg gacaggcatg cagggaaaaa 180
 gagcaccggt gacgatgtat gcgagttccc accattgcga gcaatgatta tcagccacac 240
 gacttactct tcagagctaa ccactgccat gcagagaaaa agtgaatcat attgtcatga 300
 tctacaacga agtgaaaaa tcaggcatgc taaagtgctg aaactttact gatctctcat 360
 gttggacaac aaagaatacg ggaatacatc agcaacgcaa ctcttgagct ttgcttgccg 420
 aatgaccagc tagaatttcc aagcatttac agaaacatga ctttaagttt cagaaaaaca 480
 aatacaaggc cactaaataa gcgtggggat aacatatcct ccagatgaca ggcaatctgc 540
 aacttcgagc cattcaaatg tacgattaac aaaatattta agcgccacat gagataatat 600
 atcctccaat tagggccttt agtattgtca ttagctcata accatgggtgc atcctcacat 660
 ggacgctgca taagaagttc ataatagcaa cagacatatg aacaaagcat ggtgcgcctg 720
 cccggccgga ctagctagta ctaccaatca tggaataagc tagtacccta aatgaaatta 780
 aatgggtttt tagcgattat ccacgccgtc cagaatactc taatccacaa gttgaggccg 840
 cccatgaagc cgcgagagg gcagcccatg tgtataaaag gggcctaagc tgagtggact 900
 tgctgcatca gattagt 917

5 <210> 3
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

<400> 3

aagcaatctc aagcgcagag agccaaagct ttcggtgtag ctccaagagc aaagcgaagg 60
 caag 64

10 <210> 4
 <211> 550
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

<400> 4

ES 2 562 908 T3

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

5 <210> 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 catttcttgc cggccagaaa ctattgggtc tttgcatcct tgtgaattga 240
 taaacgtgct ggtgtgtttc aatgatgtcc atgagatggg aatacaaagt caagcacgcc 300
 ttattacctt attgtgtggc tctgtctgca gaaagcaacc gggcgcatth tcttccgata 360
 ccgtggttac tttcaaattg gaagacagag acgtacacac aaggcaataa ttcagggAAC 420
 aattccatcc atccactgct ataaaaggcg gtgttgggggt gttgggtctc ttcagttcag 480
 tgt 483

10 <210> 6
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

<400> 6

gctcaagcaa tctcaaagaa cttgtcttct ccatccacac cgagtttttc ggcttcttga 60
 cttgaag 67

20 <210> 7
 <211> 1583
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

25 <400> 7

ES 2 562 908 T3

cctcttcctt tatttttgcc atcagcgtcg ttgttgaact ctcgtgcctg ttaaagatgt 60
 gtgtgttccg ctctttccaa atttcccata taatgagtag agtgagactt tgcatagcct 120
 tgccgcgtaa gtccagatt gttagttatag aagtccatca ttccaatgca ttggatgagg 180
 gttgccatgc agttggctctg atgcttggct gcgctaacca tgttgccgtt aaatcccata 240

 tcctccttgt gttcctgcac ttagcctaga tgtggtgact agtttccatg gtttgtctgc 300
 atagggtgca agtggcgttg tatggccatc cacgtttagc ctgcctatcc acggacccaa 360
 ctcagttttg tgtaattagc cgcaagaaga atttgcattt tgccggcgcc cacgttttcc 420
 agacagaaga gatttctggt gtttcgatgc agcccaggaa ctgtgcttta tatgccgatg 480
 ctattgtata catgacggat cttgttagtt tctagaagat agtatcctct tccacttacc 540
 gaagctcctg accatagccc atagggcgaa cgatgctaga tgctaaatgt gaagtggatga 600
 tgctgtgtgc gatattgagg tcacagatcc agttgttact gatagcatcg tgaactgtcc 660
 tattttgtct tcttgaaatg tcgaagagga gtggagcaat gtccttaggt gctggccatg 720
 tagctagcca gaagtccaga agctagcctt tttgccatca ccaagagtga taaccatgca 780
 ggcaacaaat acttgcattg ctgtctcgtc gcatgggatt tctatgttgg tccagggttt 840
 ttccgggtgat gcctactcat gccaaagcca cctcagacgg agggctcgtg cgaatttctc 900
 gaggtcagcc cctcgtattg cttcagtagg caggttttccg tccagttgac tttacattta 960
 ccctcggtta gctgttggtc tcccgtcag aggaattttt tacggatcct gtctaagtct 1020
 tggagcccct ctttaaggaa ataataaaag aagaaactac ttgtttttgc aatgataacg 1080
 tacatacaga tattttotaa gccatcaagt acctagcttg tctaaataac aagtgtgtcc 1140
 tggaaacaagt atcgagtacc tgaaagcaac ctgctttgaa ttggaaagga taaaaattcg 1200
 acaaggaacg acaaaaggag gcacatttct tgccggccag aaactattgg gtctttgcat 1260
 ccttgtgaat tgataaacgt gctggtgtgt ttcaatgatg tccatgagat gggaaataca 1320
 agtcaagcac gccttattac cttattgtgt ggctctgtct gcagaaagca accgggcccga 1380
 ttttcttccg ataccgtggt tactttcaaa ttggaagaca gagacgtaca cacaaggcaa 1440
 taattcaggg aacaattcca tccatccact gctataaaag gcggtgttgg ggtgttgggt 1500
 ctcttcagtt cagtgtgtc aagcaatctc aaagaacttg tcttctccat ccacaccgag 1560
 tttttcggct tcttgacttg aag 1583

<210> 8
 <211> 1516
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

5

<400> 8

ES 2 562 908 T3

cctcttccctt tatttttgcc atcagcgtcg ttgttgaact ctogtgccctg ttaaagatgt 60
gtgtgttccg ctctttccaa atttcccata taatgagtag agtgagactt tgcatagcct 120
tgcgcggtaa gtccagtatt gtagttatag aagtccatca ttccaatgca ttggatgagg 180
gttgccatgc agttggtctg atgcttggct gcgctaacca tgttgccgtt aaatcccata 240
tcctccttgt gttcctgcac ttagcctaga tgtggtgact agtttccatg gtttgtctgc 300

ataggggtgca agtggcgttg tatggccatc cacgttttagc ctgcctatcc acggacccaaa 360
ctcagttttg tgtaattagc cgcaagaaga atttgcattt tgccggcgcc cacgttttcc 420
agacagaaga gatttctggt gtttcgatgc agcccaggaa ctgtgcttta tatgccgatg 480
ctattgtata catgacggat cttgttagtt tctagaagat agtatcctct tccacttacc 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 taaccatgca 780
ggcaacaaat acttgcattg ctgtctcgtc gcatgggatt tctatgttgg tccagggttt 840
ttccgggtgat gcctactcat gccaaagcca cctcagacgg agggctcgtg cgaatttctc 900
gaggtcagcc cctcgtattg cttcagtagg caggttttcg tccagttgac tttacattta 960
ccctcggtta gctgttggtc tcccgtcag aggaattttt tacggatcct gtctaagtct 1020
tgagaccct ctttaaggaa ataataaaag aagaaactac ttgtttttgc aatgataacg 1080
tacatacaga tatttctaaa gccatcaagt acctagcttg tctaaataac aagtgtgtcc 1140
tggaacaagt atcgagtacc tgaaagcaac ctgctttgaa ttggaaagga taaaattcgt 1200
acaaggaacg acaaaggag gcacatttct tgccggccag aaactattgg gtctttgcat 1260
ccttgtgaat tgataaacgt gctggtgtgt ttcaatgatg tccatgagat gggaaataca 1320
agtcaagcac gccttattac cttattgtgt ggctctgtct gcagaaagca accggggcgca 1380
ttttcttccg ataccgtggt tactttcaaa ttggaagaca gagacgtaca cacaaggcaa 1440
taattcaggg aacaattcca tccatccact gctataaaag gcgggtgttg ggtgttgggt 1500
ctcttcagtt cagtgt 1516

<210> 9
<211> 1766
<212> ADN
<213> *Setaria italica*

<400> 9

5

ES 2 562 908 T3

tggtaaaatc aattcatatg cttatacttc aaaaaccaat ttatgtgtat atacttgga 60
 aaattagatt aagtatttca atttatttgc ttatatttca aaaataaatt cttgtgcata 120
 tacttagaaa aattagatta agtatttcaa tttatttgc tatacttcaa aatcaattc 180
 ttgtgtatat acttcaaaa attagattaa gtatttcaat ttaattgctt atatttgaag 240
 taagtcaatt gtgcaaacc attgatctac tatatatgta ataaactttg ccaatgacac 300
 agatgatgta caggaaagat agaacttca agtggatttc ttctagacga ggtcataaat 360
 ccagcggggg agttcataa 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 aaggaaaaa acaaatcagt accggtcggg gagaccaacc 660
 ggcactaatt aggccttta gtgccctccc gccaccctct cctcctctt ctctcgcgc 720
 cctctcctcc ctctcagctc ttcccagccc ctccctctcc cactgccgcc ccctccctct 780
 ctccgccgac caccatcgtc ctgcgtgatc tccctctcct caccctcggc tgcccctcct 840
 ctccccctc gctcaccct cactcgtggc agtgaggagc agcggcaaca catagatccg 900
 gtggtggcag tgcaggttcc agtgaagaag gagctagcac ggatccgacg aagaaggagc 960
 tggttgcggt ggcgtagggt ggcggccctg gcggcgcggc ctcagettcc tctccccgta 1020
 cgctctctc tctctctctc tatgagccg atccggtagg accaaggcag ttggcggtg 1080
 gtggggcggc aacggccaga tccagcgaga tgcggccggt cggatccggc gaggcagcgc 1140
 aaggccgggg cgtaaggcgg ccggcagcac cattttttt ttttttaat aggccttcac 1200
 cgccagttcc aaaaccagcg gtgatgggt atccccatca ctaccgaaag tcagacgatg 1260
 gatccaaacc gacggtgaag actggtttg agccggcagt gatgaacctc tggagtagtg 1320
 cttatggctg ggggcattga cattctttt actaacttcc ttctaccac 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 cttcaaagat 1620
 atctcaacat catacacaca gaaggaagag atgatgactc cagttaact ttcacgacg 1680
 actcctataa atacgacct ctctctgtac gcctcctcat tccaacacag gaacgggatt 1740
 cttccttctt ctggcatta gctcca 1766

5 <210> 10
 <211> 1726
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

10 <400> 10

ES 2 562 908 T3

tggtaaaatc aattcatatg cttatacttc aaaaaccaat ttatgtgtat atacttgga 60
 aaattagatt 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
 ccagcgggg agtttcataa tgatgcatca aatctacagc accgtcagga ctcggttta 420
 gaatagtaga aatgatatgt gtacgcacaa tatgtctata tatatgtata atattattca 480
 tatatgtgta tgcataaat gtatatatat aatagtatct taaatgtaat attgaagata 540
 aatagaactt tatatatatt agcgtattag aagtagtata cgtatgaata tagaataaag 600
 aaaaagaaaa taagaaaaga aaggaaaaaa acaaatcagt accggtcggg gagaccaacc 660
 ggcactaatt aggcccttta gtgccctccc gccaccctct cctccctctt ctctcgcgc 720
 cctctcctcc ctctcagctc tteccgacc ctctctctcc cactgcgcgc cctccctct 780
 ctccgcgcgc caccatcgtc ctgcgtgac tccctctct caccctcggc tgccctctct 840
 ctccccctc gctcaccct cactcgtggc agtgaggagc agcggcaaca catagatccg 900
 gtggtggcag tgcaggttcc agtgaagaag gagctagcac ggatccgacg aagaaggagc 960
 tggttcgggt ggcgtagggt ggcggccctg gcggcgcggc ctccagcttc tctccccgta 1020
 cgcctctctc tctctctctc tatgagccgg atccggtagg accaaggcag ttggcggctg 1080
 gtggggcggc aacggccaga tccagcgaga tgcggcgggt cggatccggc gaggcagcgc 1140
 aaggccgggg cgtaaggcgg ccggcagcac catttttttg ttttttaat aggccttcac 1200
 cgccagttcc aaaaccagcg gtgatggggt atccccatca ctaccgaaag tcagacgatg 1260
 gatccaaacc gacggtgaag actggtttgg agccggcagt gatgaacctc tggagtagtg 1320
 cttatggctg ggggcattga cattctttt actaactttc ttctaccac gtagtatgca 1380
 ataattgtac gtaatactag tagctgatga taagtgtgat ataagactat caagcggctc 1440
 cgacatttca caatctcgtg cagcacatgg acagctatac taacgagaag tcgaggacga 1500
 cagcccaccg acttgacaaa tctgtacaaa atatgctaga aaaatattgc accaatcaaa 1560
 cattgcccat caaggccacc aaggatacat gatgacaacg gccaatcaga cttcaaagat 1620
 atctcaacat catacacaca gaaggaagag atgatgactc cagttaact ttcatcgacg 1680
 actcctataa atacgacct ctctctgtac gcctcctcat tccaac 1726

5 <210> 11
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

10 <400> 11
 acaggaacgg gattcttct tctctggcc attagctcca 40

<210> 12
 <211> 1778

ES 2 562 908 T3

<212> ADN
 <213> *Setaria italica*

<400> 12

5

```

    tggtaaaatc aattcatatg cttataacttc aaaaaccaat ttatgtgtat atacttgtaa 60
    aaattagatt aagtatttca atttatttgc ttatatttca aaaataaatt cttgtgcata 120
    tacttagaaa aattagatta agtatttcaa tttatttgc tataactcaa aaatcaattc 180
    ttgtgtacat acttagaaaa attagattaa gtatttcaat ttaattgctt atatttgaag 240
    taagtcaatt gtgcaaacc attgatctac tatatatgca ataaactttg ccaatgacac 300
    agatgatgta caggaaagat agaacttca agtggatttc ttctagacga ggtcataaat 360
    ccagcggggg agtttcataa tgatgcatca aatctacagc accgtcagga ctcggttta 420
    gaatagtaga tatgatatgt gtacgcacaa tatgtctata tatatgtata atattattca 480
    tatatgtgta tgcataatat gtatatatat aatagtatct taaatgtaat attgaagata 540
    aatagaactt tatatatatt agcgtattag aagtagtata cgtaagaata tagaataaag 600
    aaaagaaat aagaaaagaa aggaaaaaac aatcagtac cggttgggga gaccaaccgg 660
    cactaattag gcccttagt gccttcccgc caccctctcc tcctcttct ctgcgcgcc 720
    tctctcctc ctcagetcct ccgcaccct tcctctccca ctgtcgcccc ctccctctcc 780
    ccgcgcacca ccacgtcgt gcgtgatctc cctctcctca ccctcggtg ccctcctct 840
    ccccccttg ctcacccctc actcgtggca gtgaggagcg gcggcggggg gagagcagcg 900
    gcaacacata gatccggtgg tggcggtgca ggttccagt aagaaggagc tagcacggat 960
    ccgacgaaga aggagctggt tgcggtggtg taggtgggcg gccctggcgg cgcggcctca 1020
    gcttctctc cccgtacgcc tctctctctc tctatgagcc ggatccggtg ggaccaaggc 1080
    agttggcggc tggggggcg gcaacggcca gatccagcga gatgctgccg gtcggatccg 1140
    gcgaggcagc gcaaggccgg ggcgtaaggc ggccggcagc accatttttt tgttttttta 1200
    acaggccttc accgccagtt ccaaaaccag cggtgatggg gtatccocat cactaccgaa 1260
    agtcagacga tggatccaaa ccgacggtga agactggttt ggagccggca gtgatgaacc 1320
    tctggagtag tgcttatggc tgggggcatt gacattcttt ttactaactt tcttctacc 1380
    acgtagtatg caataattgt acgtaatact agtagctgat gataagtttg atataagact 1440
    atcaagcggc ctgcacatt cacaatctcg tgcaacacat ggacagctat actaacgaga 1500
    agtcgagaac gacagccac cgacttgaca aatctgtaca aaatagcta gaaaaatatt 1560
    gcaccaatca aacattgcc atcaaggcca ccaaggatac atgatgacaa cggccaatca 1620
    gacttcaaag atactcaac atcatacaca cagaaggaag agatgatgac tccagtttaa 1680
    ctttcatcga cgactcctat aaatacgacc ctcttctgt acgcctcctc attccaacac 1740

    aggaacggga ttcttcttc ttctggccat tagctcca 1778
    
```

<210> 13
 <211> 1738
 <212> ADN

10

<213> *Setaria italica*

<400> 13

tggtaaaatc aattcatatg cttatacttc aaaaaccaat ttatgtgtat ataacttgaa 60
 aaattagatt aagtatttca atttatttgc ttatatttca aaaataaatt cttgtgcata 120
 tacttagaaa aattagatta agtatttcaa tttatttgc tataacttcaa aatcaattc 180
 ttgtgtacat acttagaaaa attagattaa gtatttcaat ttaattgctt atatttgaag 240
 taagtcaatt gtgcaaacc attgatctac tatatatgca ataaactttg ccaatgacac 300
 agatgatgta caggaaagat agaacttca agtggatttc ttctagacga ggtcataaat 360
 ccagcggggg agtttcataa tgatgcatca aatctacagc accgtcagga ctcggttta 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 gcccttagt gccctccgc caccctctcc tccctctctc ctccgcgcc 720
 tctcctcct ctcagctcct cccgaccct tctctccca ctgtcgcccc ctccctctcc 780
 ccgccgacca ccatcgtcgt gcgtgatctc cctctctca ccctcggtg ccctcctct 840
 cccccctcg ctcaccctc actcgtggca gtgaggagcg gcggcggggt gagagcagcg 900
 gcaacacata gatccggtgg tggcgggtgca ggttccagtg aagaaggagc tagcacggat 960
 ccgacgaaga aggagctggt tgcggtggcg taggtggcg gccctggcgg cgcggcctca 1020
 gcttctctc cccgtacgc tctctctctc tctatgagcc ggatccggtg ggaccaaggc 1080
 agttggcggc tgggtggggcg gcaacggcca gatccagcga gatgctgccg gtcggatccg 1140
 gcgaggcagc gcaaggccgg ggcgtaaggc ggccggcagc accatttttt tgttttttta 1200
 acaggccttc accgccagt ccaaaaccag cggtgatggg gtatccccat cactaccgaa 1260
 agtcagacga tggatccaaa ccgacggtga agactggtt ggagccggca gtgatgaacc 1320
 tctggagtag tgcttatggc tgggggcatt gacattctt ttactaactt tcttctacc 1380
 acgtagtatg caataattgt acgtaatact agtagctgat gataagtttg atataagact 1440
 atcaagcggc ctcgacatt cacaatctcg tgcaacacat ggacagctat actaacgaga 1500
 agtcgagaac gacagcccac cgacttgaca aatctgtaca aaatagcta gaaaaatatt 1560
 gcaccaatca aacattgccc atcaaggcca ccaaggatac atgatgacaa cggccaatca 1620
 gacttcaaag atatctcaac atcatacaca cagaaggaag agatgatgac tccagtttaa 1680
 ctttcatcga cgactcctat aaatacgacc ctcttctgt acgctcctc attccaac 1738

5

<210> 14

<211> 2128

<212> ADN

<213> *Setaria italica*

10

ES 2 562 908 T3

<400> 14

tatcggcgac cgctaagaga agacatttaa aataagtagt cggcattgtg ataaaaagag 60
 agcgcgatta ctgatgtgca ggttctcgat tgttgatgaa gtcgactagt cggagtcgat 120
 tctgactagt tattgattgt atggaacccg ccctcgacta gttttctagt cgagacgagt 180
 agtcgaagta gaccatcctc aactactttt ctagttgaga tgagtagtcg aagtagtcgt 240
 cggcgacttg attatttgcc tcaatctgtg tgtgacttga tcgacgagcc gtatgcagca 300
 gcttgcggtg gaaaccgact cagtcttcca ttggaacacg gagcgcgtca attctatgtc 360
 gacgtagatt tgtctgcttg gaactccaac tcagtgactt gcttcttgtt gagtagattg 420
 atcttgatga tgaggtcctt caagctcgcc tgatgatctc gacgatcacc tctacctgac 480
 ggcgcaactg ttggtgctta gaccagcaa cctaccgagg gggtagccga ggtagtgttt 540
 tgtggtgggg ctcgtcgaag atcaggaact tgaaggtgaa ctcgaacaca cgatttagac 600
 aagttcgggc tgcttatgcc gcataatacc ccatgtcatg tgtggtggtt ggattgtatt 660
 gattgatcag atatttgag ggggccctgc ctcgcttat attgccatt gcggaggca 720
 gggctacagg tcggtgttg tacaagagta ctagtcggtt ttgaccagcg agtcctactc 780
 taattgctac aagtagttc ctaatccttg actagtcctt gtccgccacg tagaccacga 840
 cgtcttgac 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 tagcagtagc aaacaatcta 1140
 tgtccacgty ttgctaatac aatgttctaa accttacagc ctactggaca gttctctagc 1200
 catgatacat gtgcatgtcc gaacaaatat ttatgggtac ccgaaaggtt aatttttgt 1260
 agtatttatg agggggagg gggcgtgac gaaaaaata acttagctaa gcgtaattgg 1320
 cttaaaaaa tacaatgttg ttccagcatc aagcctacgt gatcatttca caaaaccaac 1380
 tcaaaaagata ggtgtcatgt tccctttagt gcaaaaactta aggacaccta ccttgcaaaa 1440
 cttagctttg ttaccagaa tgaaccgcta agctcgagga gctctgaact tacatgacca 1500

ES 2 562 908 T3

aatatattaa acacaaaagt catgcatgat tttctttaat aagtatcgag caatatgggt 1560
 cgggtgtctt tcgtctcata cctctattgt cctccgtgat caacaagggg ggatccgggt 1620
 ggtgcaaggg ggctcaagcc cccctacctc tcccaaagga gaaagaaggg agaagaaagt 1680
 gaaggaagaa gaaaccccoct atattctaata gctacctccg cactgctga tcaacacaac 1740
 attcttaaaa ccatttcott ggcatttgcg catgttataa ggtacaaaag agccagccca 1800
 tatgccaagt tactaaacta aactatgatc caccatggag cgagaacaaa cgtcaacag 1860
 catcaaccaa tgcagcaatc ttgatcgcta gtactgtccg gcattatata tgaacaaat 1920
 ccagatcacc catctcatca cagtcacatg cattcatggt cacgggaacc gttagcaaac 1980
 caccaactaa tcagcattgc aacactcttc ctctataaa tgcagcgagc gggggacacc 2040
 ataaccatc acaggcactt aggatcaagt taattttgtt tctgctttgt gcgcctgtgt 2100
 tccagtaatt actttccgtg tagcaaaa 2128

<210> 15
 <211> 2062
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

5

<400> 15

tatcgcgac cgctaagaga agacatttaa aataagtagt cggcattgtg ataaaaagag 60
 agcgcgatta ctgatgtgca ggttctcgat tgttgatgaa gtcgactagt cggagtcgat 120
 tctgactagt tattgattgt atggaaccog ccctcgacta gttttctagt cgagacgagt 180
 agtcgaagta gaccatcctc aactactttt ctagttagaga tgagtagtcg aagtagtcgt 240
 cggcgacttg attatttgcc tcaatctgtg tgtgacttga tcgacgagcc gtatgcagca 300
 gcttgcggtg gaaaccgact cagctctoga ttggaacacg gagcgcgtca attctatgtc 360
 gacgtagatt tgtctgcttg gaactccaac tcagtactt gcttcttgtt gagtagattg 420
 atcttgatga tgaggtcctt caagctcgcc tgatgatctc gacgatcacc tctacctgac 480
 gcgccaactg ttggtgctta gaccagcaa cctaccgagg gggtagccga ggtagtgtt 540
 tgtggtgggg ctctcggaag atcaggaact tgaaggtgaa ctcgaaacaca cgatttagac 600
 aagttcgggc tgcttatgcc gcataatacc ccatgtcatg tgtgttggtt ggattgtatt 660
 gattgatcag atatttggag ggggccctgc ctgccttat attgccatt gccggaggca 720
 gggctacagg tcggttgtg tacaagagta ctagtcggtt ttgaccagcg agtcctactc 780
 taattgctac aagtagtttc ctaatccttg actagtcctt gtccgccacg tagaccacga 840
 cgtcttgac ctagtctctg tgtttgatac atcttgggtg acagtcgat attgtaggac 900
 tatccaagct tcccagtagg cccatagatg tatggccgac aactggataa tgtaactctg 960

10

ES 2 562 908 T3

ggtcagtact atccttatct atatagacac aaacaacgta ctatagcaga agtttaagct 1020
 cgtaaccac caatatttgg tggcatagac cacgtattgc tgatatagtg ctcgtaacc 1080
 accaatattt cgtggcatag agatctctta ggcaataaat tagcagtacg aaacaatcta 1140
 tgtccacgtg ttgctaatac aatgttctaa accttacagc ctactggaca gttctctage 1200
 catgatacat gtgcatgtcc gaacaaatat ttatgggtac ccgaaagggt aattttttgt 1260
 agtatttatg agggggaggg gggcggtgac gaaaaaata acttagctaa gcgtaattgg 1320
 cttaaaaaca tacaatgttg ttccagcatc aagcctacgt gatcatttca caaaccaac 1380
 tcaaaagata ggtgtcatgt tccttttagt gcaaaaacta aggacaccta ccttgcaaaa 1440
 cttagccttg ttaccagaa tgaaccgcta agctcgagga gctctgaact tacatgacca 1500
 aatatattaa acacaaaagt catgcatgat tttctttaat aagtatcgag caatatgggt 1560
 cgggtgtctt tcgtctcata cctctattgt cctccgtgat caacaagggt ggatccgggt 1620
 ggtgcaaggg ggctcaagcc cccctacctc tcccaaagga gaaagaaggg agaagaaagt 1680
 gaaggaagaa gaaacccct atattcta atgctacctcg cactgctga tcaacacaac 1740
 attcttaaaa ccatttcctt ggcatttgcg catgttaciaa ggtacaaaag agccagccca 1800
 tatgccaagt tactaaacta aactatgatc caccatggag cgagaacaaa cgtcaacagg 1860
 catcaaccaa tgcagcaatc ttgatcgcta gtactgtccg gcattatatac tgaacaaat 1920
 ccagatcacc catctcatca cagtcacatg cattcatggt cacgggaacc gttagcaaac 1980
 caccaactaa tcagcattgc aacactcttc ctctataaa tgcagcgagc gggggacacc 2040
 ataaaccatc acaggcactt ag 2062

5 <210> 16
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

<400> 16

gatcaagtta attttgttc tgctttgtgc gcctgtgttc cagtaattac tttccgtgta 60
 gcaaaa 66

10
 15 <210> 17
 <211> 1629
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

<400> 17

ES 2 562 908 T3

agaccagca acctaccgag ggggtaccog aggtagtgtt ttgtggtggg gctcgtcgaa 60
 gatcaggaac ttgaaggatga actogaacac acgatttaga caagttcggg ctgcttatgc 120
 cgcataatac cccatgtcat gtgtggtggt tggattgtat tgattgatca gatatttggg 180
 gggggccctg cctcgcotta tattgcccac tgccggaggc agggctacag gtcggttgtt 240
 gtacaagagt actagtccgt ttgaccagc gagtcctact ctaattgcta caagtagttt 300
 cctaactctt gactagtctt tgtccgccac gtagaccagc acgtcttga cctagtctct 360
 gtgtttgata catcttgggt tacagtccga tattgttaga ctatccaagc ttcccagtag 420
 gcccatagat gtatggccga caactggata atgtaactct gggtcagtac tatccttacc 480
 tatatagaca caaacaacgt actatagcag aagtttaagc tcgtaaccca ccaatatttg 540
 gtggcataga ccacgtattg ctgatatagt gctcgttaacc caccaatatt tcgtggcata 600
 gagatctctt aggaataaaa ttagcagtac gaaacaatct atgtccacgt gttgctaata 660
 caatgttcta aaccttacag cctactggac agttctctag ccatgatata tgtgcatgct 720
 cgaacaaata tttatgggta cccgaaaggt taattttttg tagtatttat gagggggagg 780
 ggggcgttga cgaaaaaaat aacttagcta agcgttaattg gcttaaaaaac atacaatggt 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 tctccgtga tcaacaaggg tggatccggg tggtgcaagg gggctcaagc 1140
 cccctacct ctcccaaagg agaaagaagg gagaagaag tgaaggaaga agaaaccccc 1200
 tatattctaa tgctacctcc gccactgctg atcaacacaa cattcttaa accatttctt 1260
 tggcatttgc gcatgttaca aggtacaaaa gagccagccc atatgccaag ttactaaact 1320
 aaactatgat ccaccatgga gcgagaacaa acgtcaacag gcatcaacca atgcagcaat 1380
 cttgatcgct agtactgtcc ggcattatat ctgaaacaaa tccagatcac ccatctcatc 1440
 acagtccat gcatcattg tcacgggaac cgttagcaaa ccaccaacta atcagcattg 1500
 caactctt cctcctataa atgcagcgag cgggggacac cataaacctat cacaggcact 1560
 taggatcaag ttaattttgt ttctgctttg tgccctgtg ttccagtaat tactttcctg 1620
 gtagcaaaa 1629

- 5
- <210> 18
 - <211> 1563
 - <212> ADN
 - <213> *Setaria italica*
 - <400> 18

ES 2 562 908 T3

agaccagca acctaccgag ggggtaccog 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
 cctaatecct gactagtcct tgtccgccac gtagaccacg acgtcttgca cctagtcctt 360
 gtgtttgata catcttgggt tacagtccga tattgttaga ctatccaagc ttcccagtag 420
 gccatagat gtatggccga caactggata atgtaactct gggtcagtac tatccttacc 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 taatTTTTTg tagtatttat gagggggagg 780
 ggggcgttga 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 gcaataggt tcgggtgtct ttcgtctcat 1080
 acctctattg tcctccgtga tcaacaaggg tggatccggg tggtgcaagg gggctcaagc 1140
 cccctacct ctcccaaagg agaaagaagg gagaagaaag tgaaggaaga agaaaccccc 1200
 tatattctaa tgctacctcc gccactgctg atcaacacaa cattcttaa accatttctt 1260
 tggcatttgc gcatgttaca aggtacaaaa gagccagccc atatgccaag ttactaaact 1320
 aaactatgat ccaccatgga gcgagaacaa acgtcaacag gcatcaacca atgcagcaat 1380
 cttgatcgtc agtactgtcc ggcattatat ctgaaacaaa tccagatcac ccatctcatc 1440
 acagtcacat gcattcatgg tcacgggaac cgttagcaaa ccaccaacta atcagcattg 1500
 caacactcct cctcctataa atgcagcgag cgggggacac cataaacctat cacaggcact 1560
 tag 1563

<210> 19
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

5

<400> 19

ES 2 562 908 T3

```

gtgttgctaa tacaatgttc taaaccttac agcctactgg acagttctct agccatgata 60
catgtgcatg tccgaacaaa tatttatggg taccogaaag gttaatTTTT tgtagtattt 120
atgaggggga gggggcggtt gacgaaaaaa ataacttagc taagcgtaat tggcttaaaa 180

acatacaatg ttgttccagc atcaagccta cgtgatcatt tcacaaaacc aactcaaaag 240
ataggtgtca tgttcctttt agtgcaaaac ttaaggacac ctaccttgca aaacttagct 300
ttgttaccba gaatgaaccg ctaagctcga ggagctctga acttacatga ccaaataat 360
taaacacaaa agtcatgcat gattttcttt aataagtatc gagcaatatg gttcgggtgt 420
ctttcgtctc atacctctat tgtcctccgt gatcaacaag ggtggatccg ggtggtgcaa 480
gggggctcaa gccccctac ctctccaaa ggagaaagaa gggagaagaa agtgaaggaa 540
gaagaaaccc cctatattct aatgctacct ccgccactgc tgatcaacac aacattctta 600
aaaccatttc cttggcattt gcgcatgta caaggtacaa aagagccagc ccatatgcca 660
agttactaaa ctaaactatg atccaccatg gagcgagaac aaacgtcaac aggcatcaac 720
caatgcagca atcttgatcg ctagtactgt ccggcattat atctgaaaca aatccagatc 780
accatctca tcacagtcac atgcattcat ggtcacggga accgtagca aaccaccaac 840
taatcagcat tgcaacactc ttctcctat aaatgcagcg agcgggggac accataaacc 900
atcacaggca cttaggatca agttaatTTT gtttctgctt tgtgcgctg tgttccagta 960
attactttcc gtgtagcaaa a 981

```

<210> 20
 <211> 915
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

<400> 20

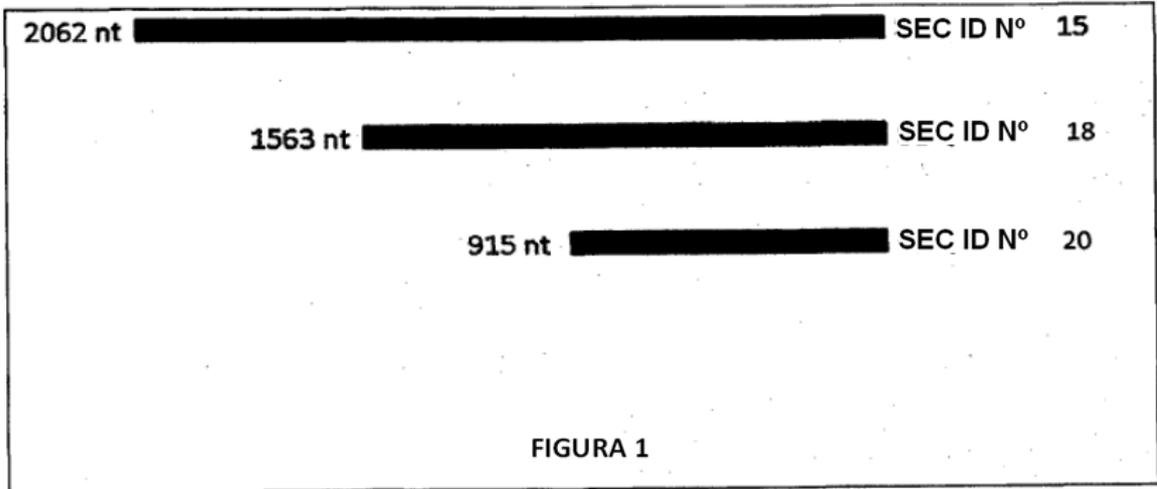
5

ES 2 562 908 T3

gtgttgctaa tacaatgttc taaacottac agcctactgg acagttctct agccatgata 60
 catgtgcatg tccgaacaaa tatttatggg taccgaaaag gttaatTTTT tgtagtattt 120
 atgaggggga ggggggCGTT gacgaaaaaa ataacttagc taagcgtaat tggcttaaaa 180
 acatacaatg ttgttccagc atcaagccta cgtgatcatt tcacaaaacc aactcaaaag 240
 ataggtgtca tgttcctttt agtgcaaaac ttaaggacac ctaccttgca aaacttagct 300
 ttgttaccca gaatgaaccg ctaagctcga ggagctctga acttacatga ccaaataat 360
 taaacacaaa agtcatgcat gattttcttt aataagtatc gagcaaatag gttcgggtgt 420
 ctttcgtctc atacctctat tgtoctcCGT gatcaacaag ggtggatccg ggtggtgcaa 480
 gggggctcaa gccccctac ctctcccaaa ggagaaagaa gggagaagaa agtgaaggaa 540
 gaagaaaccc cctatattct aatgctacct cCGccactgc tgatcaaacac 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 tgcaacactc ttctcctat aaatgcagcg agcgggggac accataaacc 900
 atcacaggca cttag 915

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN que comprende un elemento regulador que tiene una secuencia de ADN que se selecciona de entre el grupo que consiste en:
- 5 (a) una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 por ciento con la secuencia de longitud completa de ADN que se selecciona de entre las SEC ID N°: 14, 15 y 17-20 y que tiene una actividad genética reguladora,
- (b) una secuencia que se selecciona de entre las SEC ID N°: 14, 15 y 17-20, y
- 10 (c) un fragmento que comprende al menos 250 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN que se selecciona de entre las SEC ID N°: 14, 15 y 17-20 con actividad promotora,
- en la que dicho elemento regulador está unido operativamente a una molécula de polinucleótido heterólogo que se puede transcribir.
2. Una construcción de ADN que comprende un elemento regulador que tiene una secuencia de ADN que se selecciona de entre el grupo que consiste en:
- 15 (a) una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 por ciento con la secuencia de longitud completa de ADN que se selecciona de entre las SEC ID N°: 14, 15 y 17-20 y que tiene una actividad reguladora genética,
- (b) una secuencia que se selecciona de entre las SEC ID N°: 14, 15 y 17-20, y
- 20 (c) un fragmento que comprende al menos 250 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN que se selecciona de entre las SEC ID N°: 14, 15 y 17-20 con actividad promotora,
- en la que dicho elemento regulador está unido operativamente a una molécula de polinucleótido heterólogo que se puede transcribir.
3. La construcción de ADN de la reivindicación 2, en la que la molécula de polinucleótido que se puede transcribir es un gen de interés agronómico.
4. La construcción de ADN de la reivindicación 2, en la que la molécula de polinucleótido que se puede transcribir es un gen capaz de proporcionar resistencia a herbicidas en plantas.
- 25 5. La construcción de ADN de la reivindicación 2, en la que la molécula de polinucleótido que se puede transcribir es un gen capaz de proporcionar a las plantas un control de plagas de plantas.
6. Una célula vegetal transgénica transformada establemente con la molécula de ADN de la reivindicación 1.
7. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 6, en que dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal monocotiledónea.
- 30 8. Una planta transgénica transformada establemente con la molécula de ADN de la reivindicación 1.
9. Una parte de planta de la planta transgénica de la reivindicación 8, en que la parte de planta comprende la molécula de ADN.
10. Una semilla de la planta transgénica de la reivindicación 8, en que la semilla comprende la molécula de ADN.
- 35



1516 nt [REDACTED] SEC ID N° 8

483 nt [REDACTED] SEC ID N° 5

FIGURA 2

ES 2 562 908 T3

SEC ID N°10 TGGTAAAATCAATTCATATGCTTATACTTCAAAAACCAATTTATGTGTATATACTTGGAA
SEC ID N°13 TGGTAAAATCAATTCATATGCTTATACTTCAAAAACCAATTTATGTGTATATACTTGGAA

SEC ID N°10 AAATTAGATTAAGTATTTCAATTTATTTGCTTATATTTCAAAAATAAATTCTTGTGCATA
SEC ID N°13 AAATTAGATTAAGTATTTCAATTTATTTGCTTATATTTCAAAAATAAATTCTTGTGCATA

SEC ID N°10 TACTTAGAAAAATTAGATTAAGTATTTCAATTTATTTGCTTATACTTCAAAAATCAATTC
SEC ID N°13 TACTTAGAAAAATTAGATTAAGTATTTCAATTTATTTGCTTATACTTCAAAAATCAATTC

SEC ID N°10 TTGTGTATATACTTACAAAAATAGATTAAGTATTTCAATTTAATTGCTTATATTTGAAG
SEC ID N°13 TTGTGTACATACTTAGAAAAATTAGATTAAGTATTTCAATTTAATTGCTTATATTTGAAG

SEC ID N°10 TAAGTCAATTTGCAAACCCATTGATCTACTATATATGTAATAAACTTTGCCAATGACAC
SEC ID N°13 TAAGTCAATTTGCAAACCCATTGATCTACTATATATGCAATAAACTTTGCCAATGACAC

SEC ID N°10 AGATGATGTACAGGAAAGATAGAATCTTCAAGTGGATTTCTTCTAGACGAGGTCATAAAT
SEC ID N°13 AGATGATGTACAGGAAAGATAGAATCTTCAAGTGGATTTCTTCTAGACGAGGTCATAAAT

SEC ID N°10 CCAGCGGGGAGTTTCATAATGATGCATCAAATCTACAGCACCGTCAGGACTCGGGTTTA
SEC ID N°13 CCAGCGGGGAGTTTCATAATGATGCATCAAATCTACAGCACCGTCAGGACTCGGGTTTA

SEC ID N°10 GAATAGTAGAAATGATATGTGTACGCACAATATGTCTATATATATGTATAATATTATTCA
SEC ID N°13 GAATAGTAGATATGATATGTGTACGCACAATATGTCTATATATATGTATAATATTATTCA

SEC ID N°10 TATATGTGTATGCATAATATGTATATATAAATAGTATCTTAAATGTAATATTGAAGATA
SEC ID N°13 TATATGTGTATGCATAATATGTATATATAAATAGTATCTTAAATGTAATATTGAAGATA

SEC ID N°10 AATAGAACTTTATATATATTAGCGTATTAGAAGTAGTATACGTATGAATATAGAATAAAG
SEC ID N°13 AATAGAACTTTATATATATTAGCGTATTAGAAGTAGTATACGTAAAGAATATAGAATAAAG

SEC ID N°10 AAAAAAGAAAATAAGAAAAGAAAGGAAAAAACAATCAGTACCGGTCGGGGAGACCAACC
SEC ID N°13 AAAAG-AAAATAAGAAAAGAAAG-GAAAAACAATCAGTACCGGTTGGGGAGACCAACC *** . -

SEC ID N°10 GGCACATAATTAGGCCCTTTAGTGCCTCCCGCCACCCTCTCCTCCCTCTTCTCTCGCCGC
SEC ID N°13 GGCACATAATTAGGCCCTTTAGTGCCTCCCGCCACCCTCTCCTCCCTCTTCTCTCGCCGC

SEC ID N°10 CCTCTCCTCCCTCTCAGCTCTTCCCGACCCCTTCTCCTCCCACTGCCGCCCCCTCCCTCT
SEC ID N°13 CCTCTCCTCCCTCTCAGCTCTTCCCGACCCCTTCTCCTCCCACTGTGCGCCCTCCCTCT

SEC ID N°10 CTCCGCGACCAACCATCGTCCGCGTGATCTCCCTCTCCTCACCTCGGCTGCCCTCCT
SEC ID N°13 CCCC GCGACCAACCATCGTCCGCGTGATCTCCCTCTCCTCACCTCGGCTGCCCTCCT
* . *****
SEC ID N°10 CT-CCCCCTTCGCTCACCCCTCACTCGTGCCAGTGAG-----GAGCAG
SEC ID N°13 CTCCCCCTTCGCTCACCCCTCACTCGTGCCAGTGAGGAGCGGCGGGGTGAGAGCAG
* . *****-----*****
SEC ID N°10 CGGCAACACATAGATCCGGTGGTGGCAGTGCAGGTTCCAGTGAAGAAGGAGCTAGCACGG
SEC ID N°13 CGGCAACACATAGATCCGGTGGTGGCAGTGCAGGTTCCAGTGAAGAAGGAGCTAGCACGG

SEC ID N°10 ATCCGACGAAGAAGGAGCTGGTTGCGGTGGCGTAGGTGGGCGGCCCTGGCGGCGGGCCT
SEC ID N°13 ATCCGACGAAGAAGGAGCTGGTTGCGGTGGCGTAGGTGGGCGGCCCTGGCGGCGGGCCT

FIGURA 3A

