

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 428**

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: **25.08.2004** E 11155951 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016** EP 2343364

54 Título: **Elementos reguladores de tubulina para su uso en plantas**

30 Prioridad:

25.08.2003 US 497523 P

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

20.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HECK, GREGORY R.;
MALVEN, MARIANNE;
MASUCCII, JAMES y
YOU, JINSONG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 609 428 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 tubulina para su uso en plantas

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de biología molecular de plantas e ingeniería genética de plantas y a moléculas polinucleotídicas útiles para la expresión de transgenes en plantas.

Antecedentes

10 Uno de los objetivos de la ingeniería genética de plantas es producir plantas con características o rasgos agrónomicamente deseables. La expresión apropiada de un transgén deseable en una planta transgénica es un modo de conseguir este objetivo. Los elementos reguladores, tales como promotores, líderes e intrones son moléculas polinucleotídicas no codificantes que desempeñan una parte integral en la expresión global de genes en células vivas. Los elementos reguladores aislados que funcionan en plantas son, por lo tanto, útiles para modificar fenotipos de las plantas a través de los procedimientos de ingeniería genética.

15 Muchos elementos reguladores están disponibles y son útiles para proporcionar buena expresión global de un transgén. Por ejemplo, los promotores constitutivos, tales como P-FMV, el promotor del transcrito de 35S del virus del mosaico escrofularia (patente de Estados Unidos n.º 6.051.753); P-CaMV 35S, el promotor del transcrito de ARN de 35S del virus del mosaico de la coliflor (patente de Estados Unidos 5.530.196); P-Actina 1 del Arroz, el promotor del gen de la actina 1 de *Oryza sativa* (patente de Estados Unidos 5.641.876); y P-NOS, el promotor del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* son conocidos por proporcionar algún nivel de expresión génica en la mayoría o todos los tejidos de una planta durante la mayor parte o toda la vida de la planta. Aunque el trabajo previo ha proporcionado varios elementos reguladores útiles para afectar a la expresión génica en plantas transgénicas, aún existe una gran necesidad de novedosos elementos reguladores con características de expresión beneficiosas. Muchos elementos reguladores previamente identificados no logran proporcionar los patrones o niveles de expresión necesarios para conseguir completamente los beneficios de la expresión de genes seleccionados en plantas transgénicas de cultivo.

20 La organización espacial dentro de la célula eucariota y los movimientos dirigidos de los contenidos de la célula están mediados por el citoesqueleto, una red de polímeros proteicos filamentosos que penetran en el citosol. La tubulina es una de las tres familias principales de proteínas que componen el citoesqueleto.

Se ha informado de miembros de esta familia multigénica en casi todas las especies eucariotas, incluyendo levaduras, seres humanos, ratón, *Drosophila*, tabaco, maíz, arroz, soja, patata y *Arabidopsis*.

30 Hay dos tipos de proteínas tubulina en eucariotas superiores, tubulina α y β . Las tubulinas α y β de plantas están codificadas por dos familias génicas, cada una constituida por varios isotipos diferentes. Los promotores de las tubulinas α del maíz se desvelan en el documento EP-A-652286.

35 Se elaboró de la hipótesis de que un promotor de un gen de tubulina α podría tener un patrón de expresión constitutiva y que el promotor y los elementos reguladores podrían ser útiles para dirigir la expresión de un transgén, tal como un transgén de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa resistente a glifosato (EPSPS) para producir una planta tolerante a glifosato. La producción eficaz de plantas tolerantes a glifosato requiere el uso de un promotor y elementos reguladores capaces de dirigir la expresión del transgén en todos los tejidos, incluyendo los órganos reproductores más sensibles, tales como las anteras y los tejidos del meristemo. La presente invención, por tanto, proporciona dichos elementos reguladores aislados de un gen de tubulina α de *Oryza sativa* (una secuencia de ADN de la misma que se conoce a partir de EMBL-Bank: AT102560).

Sumario

45 En una realización, la invención proporciona una construcción de ADN que comprende un promotor, unido de forma funcional a una molécula polinucleotídica que se puede transcribir, unida de forma funcional a una molécula de terminación de la transcripción 3' que comprende la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 3. En otra realización, la invención proporciona plantas y semillas transgénicas que contienen dicha construcción de ADN. En otra realización, la invención proporciona un procedimiento de inhibición del crecimiento de malas hierbas en un campo de plantas transgénicas de cultivo tolerantes a glifosato, que comprende:

- 50 (i) plantar las plantas transgénicas transformadas con un casete de expresión que comprende un promotor, unido de forma funcional a una molécula de ADN que codifica un gen de tolerancia a glifosato, unida de forma funcional a una molécula de terminación de la transcripción 3', que comprende la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 3 y
- (ii) aplicar glifosato al campo a una tasa de aplicación que inhibe el crecimiento de malas hierbas, en el que el crecimiento y el rendimiento de la planta transgénica de cultivo no se ven afectados sustancialmente por la aplicación de glifosato.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: mapa del plásmido pMON77978. Se muestran los elementos genéticos y su posición relativa. P = promotor; I = intrón; L = 5' UTR; CR = región codificante; T = región 3' más secuencia cadena abajo; nptII = gen de resistencia a kanamicina, para la selección de plantas y microbiana.

- 5 Figura 2: mapa del plásmido pMON70453. Se muestran los elementos genéticos y su posición relativa. P = promotor; I = intrón; L = 5' UTR; TS = secuencia peptídica de tránsito; CR = región codificante; T = región 3' más secuencia cadena abajo; CP4 = gen de resistencia a glifosato para la selección de plantas; SPC/STR = aad para selección microbiana; se muestran los límites izquierdo y derecho de ADN T.

Descripción detallada

- 10 Las siguientes definiciones y procedimientos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos en la materia en la práctica de la presente invención. Salvo que se indique de otro modo, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por los expertos en la materia relevante.

Se desvela en el presente documento una molécula polinucleotídica que tiene actividad de regulación génica de *Oryza sativa*.

- 15 El diseño, construcción y uso de esta molécula polinucleotídica es un objetivo de la presente invención.

La secuencia polinucleotídica de esta molécula polinucleotídica se proporciona como la SEQ ID NO: 3. Esta molécula polinucleotídica es capaz de afectar a la transcripción de moléculas polinucleotídicas que se pueden transcribir, unidades de forma funcional, en tejidos tanto vegetativo como reproductores de plantas y, por lo tanto, pueden regular selectivamente la expresión de transgenes en estos tejidos.

- 20 Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula polinucleotídica" se refiere al ADN o ARN mono- o bicatenario de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas, respectivamente, leídas desde el extremo 5' (cadena arriba) hasta el extremo 3' (cadena abajo).

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia polinucleotídica" se refiere a la secuencia de una molécula polinucleotídica. Se usa la nomenclatura para las bases de ADN expuesta en 37 CFR §1.822.

- 25 Como se usa en el presente documento, la expresión "actividad de regulación génica" se refiere a una molécula polinucleotídica capaz de afectar a la transcripción o traducción de una molécula polinucleotídica que se puede transcribir, unida de forma funcional.

- 30 Una molécula polinucleotídica aislada que tiene actividad de regulación génica puede proporcionar expresión temporal o espacial o modular los niveles y tasas de expresión de la molécula polinucleotídica que se puede transcribir, unida de forma funcional. Una molécula polinucleotídica aislada que tiene actividad de regulación génica puede comprender un promotor, intrón, líder o región de terminación de la transcripción 3'.

- 35 Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a una molécula polinucleotídica que está implicada en el reconocimiento y unión de la ARN polimerasa II y otras proteínas (factores de transcripción de acción en trans) para iniciar la transcripción. Un "promotor de plantas" es un promotor nativo o no nativo que es funcional en células vegetales. Un promotor de plantas puede usarse como un elemento regulador 5' para modular la expresión de un gen o genes unidos de forma funcional. Los promotores de plantas pueden definirse por su patrón de expresión temporal, espacial o del desarrollo.

- 40 Un promotor comprende subfragmentos que tienen actividad promotora. Los subfragmentos pueden comprender dominios potenciadores y pueden ser útiles para construir promotores quiméricos. Los subfragmentos de la SEQ ID NO: 1 comprenden al menos aproximadamente 75, 85, 90, 95, 110, 125, 250, 400, 750, 1000, 1300, 1500, 1800 y 2000 nucleótidos contiguos de la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 1, hasta el total de 2190 nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. Los subfragmentos de la SEQ ID NO: 2 comprenden al menos aproximadamente 95, 110, 125, 250, 400, 750, 1000, 1300, 1500 y 1800 nucleótidos contiguos de la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 2, hasta el total de 1260 nucleótidos de la SEQ ID NO: 2.

- 45 Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio potenciador" se refiere a un elemento regulador de la transcripción de acción en cis, elemento cis a.k.a., que confiere un aspecto del control global de la expresión génica. Un dominio potenciador puede funcionar uniéndose a factores de la transcripción, factores proteicos de acción en trans que regulan la transcripción. Algunos dominios potenciadores se unen a más de un factor de transcripción, y los factores de transcripción pueden interactuar con diferentes afinidades con más de un dominio potenciador.

- 50 Los dominios potenciadores pueden identificarse por varias técnicas, incluyendo análisis de delección, es decir, delecionando uno o más nucleótidos desde el extremo 5' o internos a un promotor; análisis de proteínas de unión a ADN usando huellas de DNasa I, interferencia de metilación, ensayos de desplazamiento de movilidad en electroforesis, huella genómica *in vivo* por PCR mediada por ligamiento, y otros ensayos convencionales; o por análisis de similitud de secuencia de ADN con motivos de elementos cis conocidos por procedimientos

convencionales de comparación de secuencia de ADN. La estructura fina de un dominio potenciador puede estudiarse adicionalmente por mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o por otros procedimientos convencionales.

5 Los dominios potenciadores pueden obtenerse por síntesis química o por aislamiento desde promotores que incluyen dichos elementos, y pueden sintetizarse con nucleótidos flanqueantes adicionales que contienen sitios útiles de enzimas de restricción para facilitar la manipulación de subsecuencias. Por tanto, el diseño, construcción y uso de dominios potenciadores de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento para modular la expresión de moléculas polinucleotídicas unidas de forma funcional están abarcados por la presente memoria descriptiva.

10 Como se usa en el presente documento, el término "quimérico" se refiere al producto de la fusión de parte de dos o más moléculas polinucleotídicas diferentes. Como se usa en el presente documento, la expresión "promotor quimérico" se refiere a un promotor producido a través de la manipulación de promotores conocidos u otras moléculas polinucleotídicas. Dichos promotores quiméricos pueden combinar dominios potenciadores que pueden conferir o modular la expresión génica desde uno o más promotores, por ejemplo, fusionando un dominio
15 potenciador heterólogo desde un primer promotor hasta un segundo promotor con sus propios elementos reguladores parciales o completos. Por tanto, el diseño, construcción y uso de promotores quiméricos de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento para modular la expresión de moléculas polinucleotídicas unidas de forma funcional están abarcados por la presente memoria descriptiva.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se refiere al porcentaje de nucleótidos idénticos en una secuencia polinucleotídica lineal de una molécula polinucleotídica de referencia (o su hebra complementaria) en comparación con una molécula polinucleotídica de ensayo (o su hebra complementaria) cuando las dos secuencias están alineadas de forma óptima (con inserciones, deleciones apropiadas de nucleótidos, o huecos que hacen un total de menos del 20 por ciento de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación). La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación es
25 bien conocida para los expertos en la materia y puede realizarse por herramientas tales como el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, y preferentemente por implementaciones informatizadas de estos algoritmos, tales como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA disponibles como parte del GCG® Wisconsin Package® (Accelrys Inc., Burlington, MA). Una "fracción de identidad" para segmentos alineados de una secuencia de ensayo y una secuencia de referencia es la cantidad de componentes idénticos que están compartidos por las dos secuencias alineadas, dividida por la cantidad total de componentes en el segmento de secuencia de referencia, es decir, la secuencia de referencia completa o una parte definida más pequeña de la secuencia de referencia. El porcentaje de identidad de secuencia se representa como la fracción de identidad multiplicada por 100. La comparación de una o más secuencias polinucleotídicas puede ser con una secuencia
30 polinucleotídica de longitud completa o una parte de la misma, o con una secuencia polinucleotídica más larga.

Como se usa en el presente documento, la expresión "porcentaje sustancial de identidad de secuencia" se refiere a un porcentaje de identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 70 % de identidad de secuencia, al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia, al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia o incluso mayor identidad de secuencia, tal como aproximadamente el 98 % o aproximadamente el 99 %
40 de identidad de secuencia. Por tanto, una realización de la invención es una molécula polinucleotídica que tiene al menos aproximadamente el 70 % de identidad de secuencia, al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia, al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia o incluso mayor identidad de secuencia, tal como aproximadamente el 98 % o aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia con una secuencia polinucleotídica descrita en el presente documento.

45 **Procedimientos de aislamiento y modificación del promotor**

Puede usarse cualquiera de varios procedimientos bien conocidos para los expertos en la materia para aislar fragmentos de un promotor desvelado en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse la tecnología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar regiones flanqueantes de una genoteca de una planta usando información de secuencia disponible al público. Varios procedimientos son conocidos para los expertos en la materia
50 para amplificar moléculas polinucleotídicas desconocidas adyacentes a una región central de secuencia polinucleotídica conocida.

Los procedimientos incluyen PCR inversa (IPCR), PCR vectorette, PCR con formas en Y y enfoques de paseo genómico. Los fragmentos polinucleotídicos también pueden obtenerse por otras técnicas, tales como por síntesis directa del fragmento por medios químicos, que se pone en práctica habitualmente usando un sintetizador automatizado de oligonucleótidos. Para la presente invención, las moléculas polinucleotídicas se aislaron de ADN genómico diseñando cebadores de PCR basados en información de secuencia disponible.
55

Pueden diseñarse novedosos promotores quiméricos o modificarse por ingeniería por varios procedimientos. Por ejemplo, puede producirse un promotor quimérico fusionando un dominio potenciador desde un primer promotor hasta un segundo promotor. El promotor quimérico resultante puede tener novedosas propiedades de expresión

respecto al primer o segundo promotor. Los novedosos promotores quiméricos pueden construirse de tal modo que el dominio potenciador de un primer promotor se fusione en el extremo 5', en el extremo 3' o en cualquier posición interna al segundo promotor. La localización de la fusión del dominio potenciador respecto al segundo promotor puede causar que el promotor quimérico resultante tenga novedosas propiedades de expresión respecto a una fusión hecha en una localización diferente.

Los expertos en la materia están familiarizados con los materiales didácticos convencionales que describen condiciones específicas y procedimientos para la construcción, manipulación y aislamiento de macromoléculas (por ejemplo, moléculas polinucleotídicas, plásmidos), así como la generación de organismos recombinantes y la selección y aislamiento de moléculas polinucleotídicas.

10 Construcciones

Como se usa en el presente documento, el término "construcción" se refiere a cualquier molécula polinucleotídica recombinante, tal como un plásmido, cósmido, virus, molécula polinucleotídica de replicación autónoma, fago o molécula polinucleotídica de ADN o ARN monocatenaria o bicatenaria lineal o circular, derivada de cualquier fuente, con capacidad de integración genómica o replicación autónoma, que comprende una molécula polinucleotídica donde una o más moléculas polinucleotídicas se han unido de forma funcional.

Como se usa en el presente documento, la expresión "unido de forma funcional" se refiere a una primera molécula polinucleotídica, tal como un promotor, conectada con una segunda molécula polinucleotídica que se puede transcribir, tal como un gen de interés, donde las moléculas polinucleotídicas están dispuestas de modo que la primera molécula polinucleotídica afecta a la función de la segunda molécula polinucleotídica. Las dos moléculas polinucleotídicas pueden ser parte de una única molécula polinucleotídica contigua y pueden estar adyacentes. Por ejemplo, un promotor está unido de forma funcional a un gen de interés si el promotor regula o media la transcripción del gen de interés en una célula.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula polinucleotídica que se puede transcribir" se refiere a cualquier molécula polinucleotídica con capacidad de transcribirse en una molécula de ARN. Se conocen procedimientos para introducir construcciones en una célula de tal manera que la molécula polinucleotídica que se puede transcribir se transcriba en una molécula funcional de ARNm que se traduce y, por lo tanto, se expresa como un producto proteico. Las construcciones también pueden construirse para que sean capaces de expresar moléculas de ARN antisentido, para inhibir la traducción de una molécula de ARN específica de interés. Para la práctica de la presente invención, las composiciones convencionales y procedimientos para preparar y usar construcciones y células huésped son bien conocidos para los expertos en la materia, 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.

Las construcciones de la presente invención típicamente contendrían un promotor unido de forma funcional a una molécula polinucleotídica que se puede transcribir, unida de forma funcional a una molécula polinucleotídica de terminación de la transcripción 3'. Además, las construcciones pueden incluir moléculas polinucleotídicas reguladoras adicionales de la región no traducida 3' (3' UTR) de genes de plantas (por ejemplo, una 3' UTR para aumentar la estabilidad del ARNm, tal como la región de terminación de PI-II de la patata o las regiones de terminación 3' de la octopina o nopalina sintasa). Las construcciones pueden incluir las regiones no traducidas 5' (5' UTR) de una molécula polinucleotídica de ARNm que pueden desempeñar un papel importante en el inicio de la traducción y también pueden ser un componente genético en una construcción de expresión en plantas. Por ejemplo, se ha demostrado que moléculas polinucleotídicas líder 5' no traducidas derivadas de genes de proteínas de choque térmico potencian la expresión génica en plantas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.659.122 y la patente de Estados Unidos n.º 5.362.865). Estas moléculas polinucleotídicas reguladoras cadena arriba y cadena abajo adicionales pueden derivar de una fuente que es nativa o heteróloga con respecto a los otros elementos presente en la construcción promotora.

En la construcción, un promotor, tal como el proporcionado en la SEQ ID NO: 1-2, puede unirse de forma funcional a una molécula polinucleotídica que se puede transcribir para dirigir la transcripción de dicha molécula polinucleotídica que se puede transcribir a un nivel deseado o en un tejido o patrón del desarrollo deseado tras la introducción de dicha construcción en una célula vegetal. En algunos casos, la molécula polinucleotídica que se puede transcribir comprende una región codificante de proteína de un gen, y el promotor proporciona la transcripción de una molécula funcional de ARNm que se traduce y expresa como un producto proteico. Las construcciones también pueden construirse para la transcripción de moléculas de ARN antisentido u otro ARN inhibidor similar para inhibir la expresión de una molécula de ARN específica de interés en una célula huésped diana.

Las moléculas polinucleotídicas ejemplares que se pueden transcribir para su incorporación en construcciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, moléculas polinucleotídicas o genes de una especie diferente a la especie del gen diana, o incluso genes que se originan o están presentes en la misma especie, pero se incorporan en células destinatarias por procedimientos de ingeniería genética en lugar de reproducción clásica o técnicas de cruce. El gen o elemento genético exógeno pretende hacer referencia a cualquier gen o molécula polinucleotídica que se introduce en una célula destinataria. El tipo de molécula polinucleotídica incluida en la molécula polinucleotídica exógena

puede incluir una molécula polinucleotídica que ya está presente en la célula vegetal, una molécula polinucleotídica de otra planta, una molécula polinucleotídica de un organismo diferente o una molécula polinucleotídica generada de forma externa, tal como una molécula polinucleotídica que contiene un mensaje antisentido de un gen o una molécula polinucleotídica que codifica una versión artificial o modificada de un gen.

5 Los promotores descritos en el presente documento pueden incorporarse en una construcción usando genes marcadores que se describen y se ensayan en análisis transitorios que proporcionan una indicación de expresión génica en sistemas vegetales estables. Como se usa en el presente documento la expresión "gen marcador" se refiere a cualquier molécula polinucleotídica que se puede transcribir, cuya expresión puede explorarse o valorarse de algún modo. Los procedimientos para ensayar la expresión de genes marcadores en ensayos transitorios son conocidos para los expertos en la materia.

10 Se ha informado de la expresión transitoria de genes marcadores usando una diversidad de plantas, tejidos y sistemas de suministro de ADN. Por ejemplo, los tipos de análisis transitorios pueden incluir, aunque sin limitación, el suministro génico directo mediante electroporación o bombardeo con partículas de tejidos en cualquier ensayo transitorio de plantas usando cualquier especie de planta de interés. Dichos sistemas transitorios incluirían, aunque sin limitación, electroporación de protoplastos de una diversidad de fuentes de tejidos o bombardeo con partículas de tejidos específicos de interés. La presente memoria descriptiva abarca el uso de cualquier sistema de expresión transitoria para evaluar los promotores o fragmentos promotores unidos de forma funcional a cualquier molécula polinucleotídica que se puede transcribir incluyendo, aunque sin limitación, genes indicadores seleccionados, genes marcadores o genes de interés agronómico. Ejemplos de tejidos vegetales ideados para su ensayo en transitorios mediante un sistema apropiado de suministro incluirían, aunque sin limitación, tejidos de la base foliar, callos, cotiledones, raíces, endosperma, embriones, tejido floral, polen y tejido epidérmico.

15 Puede usarse cualquier gen marcador valorable o explorable en un ensayo transitorio. Los genes marcadores ejemplares para análisis transitorios de los promotores o fragmentos promotores de la presente invención incluyen un gen GUS (patente de Estados Unidos n.º 5.599.670) o un gen GFP (patentes de Estados Unidos n.º 5.491.084 y 6.146.826). Las construcciones que contienen los promotores o fragmentos promotores unidos de forma funcional a un gen marcador se suministran a los tejidos y los tejidos se analizan por el mecanismo apropiado, dependiendo del marcador. Los análisis cuantitativos o cualitativos se usan como una herramienta para evaluar el perfil de expresión potencial de los promotores o fragmentos promotores cuando están unidos de forma funcional a genes de interés agronómico en plantas estables.

20 Por tanto, en una realización preferente, una molécula polinucleotídica de la presente invención mostrada en SEQ ID NO: 3 se incorpora en una construcción de modo que un promotor está unido de forma funcional a una molécula polinucleotídica que se puede transcribir, que proporciona un marcador de selección, de exploración o valorable. Los marcadores para su uso en la práctica de la presente invención incluyen moléculas polinucleotídicas que se pueden transcribir que codifican la β -glucuronidasa (GUS), la proteína verde fluorescente (GFP), la luciferasa (LUC), proteínas que confieren resistencia a antibióticos o proteínas que confieren tolerancia a herbicidas. Los marcadores útiles de resistencia a antibióticos, incluyendo aquellos genes que codifican proteínas que confieren resistencia a kanamicina (*nptII*), higromicina B (*aph IV*), estreptomycinina o espectinomycinina (*aad*, *espec/estrep*) y gentamicina (*aac3* y *aacC4*) son conocidos en la técnica.

25 Los herbicidas para los que se ha demostrado tolerancia en plantas transgénicas y para los que puede aplicarse el procedimiento de la presente invención incluyen, aunque sin limitación: glifosato, glufosinato, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinil, delapon, ciclohezanodiona, inhibidores de la protoporfirionógeno oxidasa y herbicidas de isoxasflutol. Las moléculas polinucleotídicas que codifican proteínas implicadas en la tolerancia a herbicidas son conocidas en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, una molécula polinucleotídica que codifica la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) descrita en la patente de Estados Unidos n.º 5.627.061, la patente de Estados Unidos n.º 5.633.435 y la patente de Estados Unidos n.º 6.040.497 y *aroA* descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.094.945 para tolerancia a glifosato; una molécula polinucleotídica que codifica la bromoxinil nitrilasa (*Bxn*) descrita en la patente de Estados Unidos n.º 4.810.648 para tolerancia a bromoxinil; una molécula polinucleotídica que codifica la fitoeno desaturasa (*crtI*) descrita en Misawa y col. (1993) Plant Journal 4:833-840 y Misawa y col. (1994) Plant Journal 6:481-489 para tolerancia a norflurazona; una molécula polinucleotídica que codifica la acetohidroxiácido sintasa (AHAS, *aka* ALS) descrita en Sathasiivan y col. (1990) Polynucleotides Research 18:2188-2193 para tolerancia a herbicidas de sulfonilurea; y el gen *bar* descrito en DeBlock, y col. (1987) EMBO Journal 6:2513-2519 para tolerancia a glufosinato y bialaphos.

30 En una realización de la invención, una molécula polinucleotídica mostrada en la SEQ ID NO: 3 se incorpora en una construcción de modo que está unida de forma funcional a una molécula polinucleotídica que se puede transcribir, que es un gen de interés agronómico. Como se usa en el presente documento, la expresión "gen de interés agronómico" se refiere a una molécula polinucleotídica que se puede transcribir que incluye un gen que proporciona una característica deseable asociada con la morfología, fisiología, crecimiento y desarrollo, rendimiento, potenciación nutricional, resistencia a enfermedad o plaga, o tolerancia ambiental o química de la planta. La expresión de un gen de interés agronómico es deseable para conferir un rasgo agronómicamente importante. Un gen de interés agronómico que proporciona un rasgo agronómico beneficioso a plantas de cultivo puede ser, por ejemplo, incluyendo, aunque sin limitación, elementos genéticos que comprenden resistencia a herbicidas (patentes

de Estados Unidos n.º 5.633.435 y 5.463.175), rendimiento aumentado (patente de Estados Unidos n.º 5.716.837), control de insectos (patentes de Estados Unidos n.º 6.063.597; 6.063.756; 6.093.695; patente de Estados Unidos n.º 5.942.664; y 6.110.464), resistencia a enfermedades fúngicas (patentes de Estados Unidos n.º 5.516.671; 5.773.696; 6.121.436; 6.316.407 y 6.506.962), resistencia a virus (patentes de Estados Unidos n.º 5.304.730 y 6.013.864), resistencia a nematodos (patente de Estados Unidos n.º 6.228.992), resistencia a enfermedades bacterianas (patente de Estados Unidos n.º 5.516.671), producción de almidón (patentes de Estados Unidos n.º 5.750.876 y 6.476.295), producción modificada de aceites (patente de Estados Unidos n.º 6.444.876), producción elevada de aceite (patentes de Estados Unidos n.º 5.608.149 y 6.476.295), contenido modificado de ácidos grasos (patente de Estados Unidos n.º 6.537.750), producción elevada de proteínas (patente de Estados Unidos n.º 6.380.466), maduración de los frutos (patente de Estados Unidos n.º 5.512.466), nutrición potenciada de animales y seres humanos (patentes de Estados Unidos n.º 5.985.605 y 6.171.640), biopolímeros (patente de Estados Unidos n.º 5.958.745 y publicación de patente de Estados Unidos n.º US20030028917), resistencia a estrés ambiental (patente de Estados Unidos n.º 6.072.103), péptidos farmacéuticos (patente de Estados Unidos n.º 6.080.560), rasgos mejorados de procesamiento (patente de Estados Unidos n.º 6.476.295), digestibilidad mejorada (patente de Estados Unidos n.º 6.531.648), bajo contenido de rafinosa (patente de Estados Unidos n.º 6.166.292), producción de enzimas industriales (patente de Estados Unidos n.º 5.543.576), aroma mejorado (patente de Estados Unidos n.º 6.011.199), fijación de nitrógeno (patente de Estados Unidos n.º 5.229.114), producción de semillas híbridas (patente de Estados Unidos n.º 5.689.041) y producción de biocombustible (patente de Estados Unidos n.º 5.998.700).

Como alternativa, una molécula polinucleotídica que se puede transcribir puede lograr los fenotipos mencionados anteriormente codificando una molécula de ARN que causa la inhibición dirigida de la expresión de un gen endógeno, por ejemplo, mediante ARN antisentido, inhibidor (iARN) o mecanismo mediados por cosupresión. El ARN también podría ser una molécula de ARN catalítico (es decir, una ribozima) modificada por ingeniería para escindir un producto de ARNm endógeno. Por tanto, cualquier molécula polinucleotídica que codifique una proteína o ARNm que exprese un fenotipo o cambio de morfología de interés puede ser útil para la práctica de la presente invención.

Las construcciones de la presente invención generalmente son construcciones de ADN con doble borde de plásmido Ti que tienen las regiones del borde derecho (RB o AGRtu.RB) y el borde izquierdo (LB o AGRtu.LB) del plásmido Ti aisladas de *Agrobacterium tumefaciens* que comprenden un ADN T, que junto con moléculas de transferencia proporcionadas por las células de *Agrobacterium*, permite la integración del ADN T en el genoma de una célula vegetal. Las construcciones también contienen los segmentos de ADN estructural plasmídico que proporcionan la función de replicación y la selección por antibiótico en células bacterianas, por ejemplo, un origen de replicación de *Escherichia coli* tal como *ori322*, un origen de replicación de amplio espectro de huésped tal como *oriV* u *oriRi*, y una región codificante para un marcador de selección tal como *espec/estrp* que codifica la aminoglucósido adeniltransferasa Tn7 (*aadA*) que confiere resistencia a espectinomicina o estreptomycin, o un gen marcador de selección en gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación de plantas, la cepa bacteriana huésped a menudo es *Agrobacterium tumefaciens* ABI, C58 o LBA4404, sin embargo, otras cepas conocidas para los expertos en la materia de transformación de plantas pueden funcionar en la presente invención.

Plantas y células vegetales transformadas

Como se usa en el presente documento, el término "transformado" se refiere a una célula, tejido, órgano u organismo en que se ha introducido una molécula polinucleotídica foránea, tal como una construcción. La molécula polinucleotídica introducida puede integrarse en el ADN genómico de la célula, tejido, órgano u organismo destinatario de modo que la molécula polinucleotídica introducida se hereda por la posterior descendencia. Una célula u organismo "transgénico" o "transformado" también incluye la descendencia de la célula u organismo y la descendencia producida a partir de un programa de cruces que emplea dicha planta transgénica como un progenitor en un cruce y que muestra un fenotipo alterado resultante de la presencia de una molécula polinucleotídica foránea. Una construcción de transformación de plantas que contiene un promotor de la presente invención puede introducirse en plantas por cualquier procedimiento de transformación de plantas. Los procedimientos y materiales para transformar plantas introduciendo una construcción de expresión en plantas en el genoma de una planta en la práctica de la presente invención pueden incluir cualquiera de los procedimientos bien conocidos y demostrados, incluyendo electroporación, como se ilustra en la patente de Estados Unidos n.º 5.384.253; bombardeo con microproyectiles, como se ilustra en las patentes de Estados Unidos n.º 5.015.580; 5.550.318; 5.538.880; 6.160.208; 6.399.861; y 6.403.865; transformación mediada por *Agrobacterium*, como se ilustra en las patentes de Estados Unidos n.º 5.824.877; 5.591.616; 5.981.840; y 6.384.301; y transformación de protoplastos, como se ilustra en la patente de Estados Unidos n.º 5.508.184.

Los procedimientos para transformar específicamente dicotiledóneas son bien conocidos para los expertos en la materia. Se ha descrito la transformación y regeneración de plantas usando estos procedimientos para varios cultivos incluyendo algodón (*Gossypium hirsutum*), soja (*Glycine max*), cacahuete (*Arachis hypogaea*) y miembros del género *Brassica*.

Los procedimientos para transformar monocotiledóneas son bien conocidos para los expertos en la materia. Se ha descrito la transformación y regeneración de plantas usando estos procedimientos para varios cultivos incluyendo cebada (*Hordeum vulgare*); maíz (*Zea mays*); avena (*Avena sativa*); dátilo aglomerado (*Dactylis glomerata*); arroz

(*Oryza sativa*, incluyendo las variedades indica y japónica); sorgo (*Sorghum bicolor*); caña de azúcar (*Saccharum sp*); festuca alta (*Festuca arundinacea*); especies de céspedes (por ejemplo, especies: *Agrostis stolonifera*, *Poa praterisis*, *Stenotaphrum secundatum*); trigo (*Triticum aestivum*) y alfalfa (*Medicago sativa*). Es evidente para los expertos en la materia que pueden usarse varias metodologías de transformación y modificarse para la producción de plantas transgénicas estables a partir de cualquiera de varios cultivos diana de interés.

Las plantas transformadas se analizan para la presencia de los genes de interés y el nivel y/o perfil de expresión conferido por los promotores de la presente invención. Los expertos en la materia son conscientes 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 transferencias de Northern, enfoques basados en PCR, análisis bioquímicos, procedimientos de exploración fenotípica, evaluaciones de campo y ensayos de inmunodiagnóstico.

Las semillas de la presente invención pueden recogerse de plantas transgénicas fértiles y usarse para cultivar generaciones descendientes de plantas transformadas de la presente invención, incluyendo líneas de plantas híbridas que comprenden la construcción de la presente invención y que expresan un gen de interés agronómico.

La presente memoria descriptiva también proporciona partes de las plantas de la presente invención. Las partes de las plantas incluyen semillas, endosperma, óvulos y polen. En una realización particularmente preferente de la presente invención, la parte de la planta es una semilla.

Otro aspecto más de la invención es un procedimiento de inhibición del crecimiento de malas hierbas en un campo de plantas transgénicas de cultivo, que comprende plantar primero las plantas transgénicas transformadas con un casete de expresión que comprende un promotor, unido de forma funcional a una molécula de ADN que codifica un gen de tolerancia a glifosato, unido de forma funcional a una molécula polinucleotídica aislada que tiene actividad de regulación génica y que comprende una secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 3 y después aplicar glifosato al campo a una tasa de aplicación que inhibe el crecimiento de malas hierbas, en el que el crecimiento y rendimiento de la planta transgénica de cultivo no se ven sustancialmente afectados por la aplicación de glifosato. La tasa de aplicación de glifosato es la tasa eficaz necesaria para controlar las malas hierbas en un cultivo particular tolerante a glifosato; estas tasas pueden variar de 0,56 a 17,93 kg/ha (8 a 256 onzas/acre), preferentemente de 1,12 a 8,97 kg/ha (16 a 128 onzas/acre) y más preferentemente de 2,24 a 6,72 kg/ha (32 a 96 onzas/acre). El glifosato se aplica al menos una vez durante el crecimiento del cultivo tolerante a glifosato y puede aplicarse 2, 3 o 4 veces durante el crecimiento del cultivo o más, según lo necesario, para controlar las malas hierbas en el campo.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferentes de la invención. Debe apreciarse por los expertos en la materia que las técnicas desveladas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención. Los ejemplos no cubiertos por el alcance de las reivindicaciones son con propósitos ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: identificación de genes constitutivos

Se identificaron genes de arroz que tienen un patrón de expresión constitutiva como la primera etapa en el aislamiento de elementos heterólogos para su uso en la construcción de casetes transgénicos. Los genes implicados en las funciones celulares básicas, tales como la formación del citoesqueleto a menudo se expresan de forma constitutiva en toda la planta. Estos genes a menudo existen en familias génicas, sin embargo, y aunque la expresión global de los miembros de la familia puede ser constitutiva en toda la planta, los miembros individuales pueden tener patrones de expresión más restringidos, temporales, de desarrollo o específicos de órgano/tejido/tipo de célula. Con esta comprensión, el foco para la selección de genes candidatos individuales fue las familias génicas específicas usando datos de estudios de expresión génica.

Se identificaron las secuencias de la región no traducida (UTR) 5' de miembros de familias multigénicas seleccionadas (incluyendo tubulina, actina, histona, etc.) usando la secuencia genómica del arroz. Se diseñaron cebadores que hibridan con las secuencias 5' UTR y se realizó PCR usando procedimientos convencionales. Los posteriores productos de moléculas polinucleotídicas se dispusieron en serie sobre filtros de nylon para análisis de expresión de ARNm. Los filtros después se sondearon con moléculas de ADNc derivadas de combinaciones de ARNm de arroz de tejido de raíz, hoja, grano, antera, ovario o gluma. El experimento se repitió dos veces y los resultados se usaron para analizar la expresión de los genes seleccionados. A partir del análisis de los datos de expresión, se eligieron veinte genes para análisis adicionales usando PCR a real time con cebadores específicos de 3' UTR. Los cebadores se usaron junto con el kit SYBR Green (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA) usando una máquina Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA) y protocolos convencionales suministrados por el fabricante para amplificar secuencias fuera del ADNc de la hoja, raíz, antera, gineceo o ápice. Los resultados entonces se compararon con el nivel de expresión para el gen de la actina 1 del arroz, cuyo promotor y primer intrón son conocidos por proporcionar alta tolerancia a glifosato cuando están unidos de forma funcional a un gen EPSPS resistente a glifosato. Se demostró que un gen de tubulina α , denominado Os-TubA-3, se expresaba en arroz en todos los tejidos a niveles mayores del gen ract1.

5 El patrón de expresión generalmente constitutiva del gen Os-TubA-3 se confirmó adicionalmente cuando se realizó un análisis BLASTN usando su secuencia 3' UTR como una consulta de las bibliotecas de EST de arroz preparadas a partir de diversos órganos de arroz en diversas fases del desarrollo (véase la Tabla 1). Los resultados se compararon de nuevo con el nivel de expresión para el gen de la actina 1 del arroz. Una característica de expresión particularmente deseable del gen TubA-3 fue la representación de EST en las estructuras florales en desarrollo, incluyendo las anteras. Se hizo una búsqueda BLASTN usando la secuencia 3' UTR de Os-TubA-3 para identificar un BAC de arroz que contenía una copia genómica completa del gen Os-TubA-3 que incluye la región promotora.

Tabla 1: Existencia de secuencias 3' UTR respectivas en bibliotecas de EST de arroz.

Biblioteca	Cantidad total de lecturas 5' y 3'	Existencia de actina 1 del arroz	Existencia de Os-TubA-3
panoja, crujiente - flósculo abierto 3/4	20.227	7	>16
panoja en desarrollo	7.909	5	>16
antera tardía	5.956	14	4
semilla en desarrollo	7.453	1	8
semilla seca	9.362	0	0
semilla germ.	9.743	0	1
ápice vegetativo	7.672	2	>16
hoja, hoja 3-5	10.040	0	1
hoja, brote 3-4	9.209	1	0
hoja, vaina alargada	7.897	1	3
raíz, hoja 3-5	10.524	2	4
raíz, brote 3-4	10.624	1	9
raíz, tercer brote - leche	7.481	1	3

10 **Ejemplo 2: construcciones**

Se aisló el promotor de Os-TubA-3 de la región genómica cadena arriba del gen Os-TubA-3 para su incorporación en un casete de expresión y su posterior caracterización en plantas transgénicas. Se diseñaron los oligonucleótidos OsTUBA136-1 y OsTUBA136-2 (proporcionados como SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, respectivamente) para amplificar la región 5' (promotor y 5' UTR). La región promotora cadena arriba del gen Os-TubA-3 se amplificó empezando inmediatamente cadena arriba del codón de inicio de la traducción y acabando aproximadamente 1,2 kb inmediatamente cadena arriba del inicio del sitio de inicio de la transcripción (deducido observando la 5' UTR más larga presente para el gen Os-TubA-3 en la colección EST). La secuencia promotora se proporciona como la SEQ ID NO: 2. La secuencia líder se proporciona como la SEQ ID NO: 5. El primer intrón del gen Os-TubA-3 (que descansa cadena abajo del inicio de la traducción) se amplificó con los oligonucleótidos OsTUBA136-3 y OsTUBA136-4 (proporcionados como la SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, respectivamente). La secuencia intrónica se proporciona como la SEQ ID NO: 4. El intrón después se retiró de su contexto nativo y se colocó dentro de la 5' UTR inmediatamente cadena arriba del codón de inicio de la traducción para producir un promotor quimérico de Os-TubA-3. La secuencia promotora quimérica se proporciona como la SEQ ID NO: 1.

25 Después se crearon las construcciones para la caracterización del promotor de Os-TubA-3 *in planta* para la expresión de un transgén unido de forma funcional. El promotor se ligó en una construcción de expresión en plantas de modo que el promotor estuviera unido de forma funcional al transgén de interés.

30 La región 3' de Os-TubA-3 (500-600 pb de secuencia inmediatamente cadena abajo del codón de terminación de la traducción que incluye la 3' UTR más secuencias cadena abajo adyacentes) también se amplificó usando los oligonucleótidos OsTUBA136-5 y OsTUBA136-6 (proporcionados como la SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11). La secuencia de la región 3' se proporciona como la SEQ ID NO: 3. La región 3' se usó en la construcción del vector de transformación en plantas para proporcionar diversidad adicional de elementos sobre las construcciones existentes y para capturar cualquier capacidad reguladora (transcripcional o al nivel de estabilidad del ARNm) presente dentro de la secuencia. La región 3' de Os-TubA-3 se ligó en el extremo 3' del transgén de interés. Para la caracterización de

la actividad GUS, el vector de transformación en plantas pMON77978 mostrado en la Figura 1 contiene el gen indicador GUS como el transgén de interés. Para la caracterización de tolerancia a glifosato, el vector de transformación en plantas pMON70453 mostrado en la Figura 2 contiene el gen CTP2/CP4 EPSPS como el transgén de interés.

5 Ejemplo 3: caracterización del promotor en sistemas transitorios

Se usó el vector de expresión en plantas pMON77978 para transformar callos de maíz usando bombardeo con partículas para la caracterización del promotor *in planta*. Después se analizó la actividad GUS de forma cuantitativa. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Se demostró que el promotor de Os-TubA-3 tiene un nivel deseable de expresión en este sistema transitorio.

10 **Tabla 2: Análisis cuantitativo de la actividad GUS en callos de maíz.**

Construcción	Actividad GUS (pmoles/ μ g proteína/hora)
Os-TubA-3 (pMON77978)	17,51 \pm 2,16
E35S (pMON77952)	33,53 \pm 11,28
Vector de GUS sin promotor de control blanco (pMON77951)	1,67 \pm 0,502

Ejemplo 4: caracterización del promotor en plantas transgénicas

Se usó el vector de expresión en plantas pMON70453 para transformar maíz usando un procedimiento de transformación mediado por *Agrobacterium*. Por ejemplo, se usa una cepa C58 desarmada de *Agrobacterium* que alberga una construcción binaria de ADN de la presente invención. La construcción de ADN se transfiere a *Agrobacterium* por un procedimiento de reproducción triparental (Ditta y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 77:7347-7351, 1980). Se inician cultivos líquidos de *Agrobacterium* a partir de reservas de glicerol o a partir de una placa recién sembrada en estrías y se cultivan durante una noche a 26 °C-28 °C con agitación (aproximadamente 150 rpm) hasta fase de crecimiento semi-log en medio LB líquido, pH 7,0 que contiene los antibióticos apropiados. Las células de *Agrobacterium* se resuspenden en el medio de inoculación (líquido CM4C) y la densidad se ajusta a DO₆₆₀ de 1. Se inoculan embriones de maíz HiNxLH198 y Hill inmaduros de tipo II recién aislados con *Agrobacterium* que contiene una construcción y se cocultivan varios días en la oscuridad a 23 °C. Los embriones después se transfieren a medio de retardo y se incuban a 28 °C durante varios o más días. Todos los cultivos posteriores se mantienen a esta temperatura. Los embriones se transfieren a un primer medio de selección que contiene carbenicilina 500/glifosato 0,5 mM. Dos semanas después, se transfiere el tejido superviviente a un segundo medio de selección que contiene carbenicilina 500/glifosato 1,0 mM. Se subcultivan los callos supervivientes cada 2 semanas hasta que pueden identificarse los eventos. Esto conlleva aproximadamente 3 subcultivos en glifosato 1,0 mM. Una vez se han identificado los eventos, se engrosa el tejido para regenerarlo. Las plántulas (eventos) se transfieren a medio MSOD en un recipiente de cultivo y se mantienen durante dos semanas. La eficacia de transformación se determina dividiendo la cantidad de eventos producidos por la cantidad de embriones inoculados. Después las plantas con raíces se transfieren a la tierra. Los expertos en la materia de procedimientos de transformación de monocotiledóneas pueden modificar este procedimiento para proporcionar plantas monocotiledóneas transgénicas sustancialmente idénticas que contienen las composiciones de ADN o usar otros procedimientos, tales como pistola de partículas, que son conocidos por proporcionar plantas monocotiledóneas transgénicas.

Se generaron aproximadamente 25 eventos por construcción. Los eventos se seleccionaron en medio que contenía glifosato, se transfirieron a la tierra, y después se movieron al invernadero. En el invernadero, las plantas se pulverizaron con glifosato (0,84 kg de equivalentes de ácido de glifosato-ha⁻¹) usando la formulación Roundup Ultra en aproximadamente la fase de hoja V4. Las plantas que sobrevivieron sin lesiones (<10 % de clorosis y malformación) se mantuvieron y transfirieron a macetas grandes. En aproximadamente la fase V8, se hizo una segunda aplicación de glifosato como anteriormente. Esta segunda pulverización fue para evaluar la tolerancia reproductora masculina. Los eventos de las nuevas construcciones se valoraron para la fertilidad masculina tras la maduración de las panículas. La clasificación de fertilidad masculina (MFR) se valora sobre un intervalo donde MFR = 1 es esterilidad completa (para panículas que carecen de flósculos desarrollados) y MFR = 5 es polen completo desprendido (para anteras completamente desarrolladas con polen desprendido); MFR = 4-5 se considera comercialmente viable. Se usó una combinación de análisis de Taqman y Southern para evaluar el número de copias del transgén en los eventos que van al invernadero. El análisis de Southern usando los nuevos elementos también demostró que estas secuencias heterólogas no muestran hibridación cruzada con secuencias endógenas de maíz - una cualidad significativa para la caracterización de eventos. Estas evaluaciones prematuras son parte de un procedimiento para seleccionar casetes equivalentes a P-Os.Act1/CP4. Los criterios importantes para una construcción satisfactoria incluyen buena eficacia de transformación (número de eventos producidos/número de explantes inoculados) y la capacidad de proporcionar de forma reproducible transformantes vegetativa y reproductivamente tolerantes que portan una única copia del transgén. Se muestra un resumen de las evaluaciones de transformación temprana y de invernadero en la Tabla 3. Los eventos de una única copia que pasaron las

evaluaciones de invernadero se hicieron avanzar a las evaluaciones de campo.

Tabla 3: Evaluaciones de transformación prematura y de invernadero.

Construcción	Frecuencia de transformación	Número de eventos	Copia única	Copia única y vegetativamente tolerante en R0	Copia única, vegetativamente tolerante y MFR = 4-5 en R0
P-Os.Act1 pMON30167	5,1 %	24	33 %	21 %	21
P-Os.TubA-3 pMON70453	5,2 %	49	53 %	37 %	33

5 Se hicieron evaluaciones de campo en Puerto Rico con plantas de maíz de generación F2. Las plantas se trataron con dos aplicaciones de 3,36 kg de equivalentes de ácido de glifosato·ha⁻¹ en formulación Roundup UltraMax™ (tasa actual de uso en campo por encima de 4X). Se hizo un tratamiento en fase V4 y se hizo un segundo tratamiento en fase V8. Las clasificaciones vegetativas para clorosis (<10 % de clorosis) y malformación (<10 % de malformación) se emprendieron 10 días después del tratamiento. Las clasificaciones de fertilidad masculina (MFR) se emprendieron en la madurez de la panícula. Para la comparación, se evaluó el evento comercial NK603 (pMON25496 que contiene P-Os.Act1/CP4 EP- SPS::P-e35S/CP4 EPSPS). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Evaluación de campo.

Construcción	Número de eventos	Eventos que pasaban la clasificación de malformación en V8	Eventos que pasaban la clasificación de clorosis en V8	Eventos que pasaban las clasificaciones vegetativas y MFR = 4-5
P-Os.Act1 + E35S NK603	1	1	1	1
P-Os.TubA-3 pMON70453	7	6	6	6

15 Después se midió la acumulación de proteína CP4 EPSPS (µg/mg de proteína total mostrada como media ± error típico) en diversos tejidos de maíz para eventos de una única copia en plantas F1 hemicigólicas que mostraban buena eficacia en campo para tolerancia a glifosato. Para la comparación, el evento comercial NK603 tiene aproximadamente 21 ppm o aproximadamente 1,4 µg de CP4 EPSPS/mg de proteína total en la fase de lámina foliar V4 cuando se cultiva en condiciones similares. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Acumulación de CP4 EPSPS en diversos tejidos de maíz.

Construcción	Número de eventos de una única copia	Lámina foliar V4 en fase V4	Lámina foliar V9-10 en fase V9-10	Panícula inmadura (5-10 cm)	Punta de la raíz (~1 cm)
P-Os.TubA-3 pMON70453	10	0,041 ± 0,005	0,070 ± 0,006	0,144 ± 0,014	0,095 ± 0,016

20 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Monsanto Technology, LLC
- <120> Elementos reguladores de tubulina para su uso en plantas
- <130> 38-21(53419)A
- <150> EP 04786581.1
- <151> 25-08-2004
- <150> US 60/497523
- <151> 25-08-2003
- <160> 11

35

ES 2 609 428 T3

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 2190

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

<400> 1

gcctcgagac aacaacatgc ttctcatcaa catggaggga agagggaggg agaaagtgtc 60
 gcctggtcac ctccattgtc aactagcca ctggccagct ctcccacacc accaatgcca 120
 ggggagagct ttagcacagc cacogttca cctccaccac cgactaccc tagcttcgcc 180
 caacagccac cgtcaacgcc tcctctcgt caacataaga gagagagaga agaggagagt 240
 agccatgtgg ggaggaggaa tagtacatgg ggcctaccgt ttggcaagtt attttgggtt 300
 gccaaagttag gccaaataagg ggagggattt ggccatccgg ttggaaaggt tattggggta 360
 gtatcttttt actagaattg tcaaaaaaaaa atagtttgag agccatttgg agaggatgtt 420
 gcctgttaga ggtgctctta ggacatcaaa ttccataaaa acatcagaaa aattctctcg 480
 atgaagattt ataaccacta aaactgccct caattcgaag ggagttcaaa acaatttaaaa 540
 tcatgttcga attgagtttc aatttcaact taacccttt gaaatctcaa tggtaaaaca 600
 tcaaccctgc aggtagcatg gttcttttta ttcctttcaa aaagagttaa ttacaaacag 660
 aatcaaaaact aacagttag cccaaggccc atccgagcaa acaatagatc atgggcccagg 720
 cctgccacca ccctcccct cctggctccc gctcttgaat ttcaaaatcc aaaaatatcg 780
 gcacgactgg ccgcccagcg agcggggcga aatgacgga acaaccctc gaattctacc 840
 ccaactacgc ccaccaacc acacgccact gacaatccgg tcccaccctt gtgggcccac 900
 ctacaagcga gacgtcagtc gctcgagca accagtgggc ccacctcca gtgagcggcg 960
 ggtagatctg gactcttacc caccacact aaacaaaacg gcatgaatat tttgcactaa 1020

5

10

ES 2 609 428 T3

aacctcaga aaaattccga tattccaaac cagtacagtt cctgaccggt ggaggagcca 1080
aagtggagcg gagtgtaaaa ttgggaaact taatcgaggg ggtaaacgc áaaaaacgccg 1140
aggcgcctcc cgctctatag aaaggggagg agtgggaggt ggaaacccta ccacaccgca 1200
gagaaaggcg tcttcgtact cgcctctctc cgcgccctcc tccgccgccc ctccgccgccc 1260
ttcgtctccg ccgccaccgg ctagccatcc aggtaaaaca aacaaaaacg gatctgatgc 1320
ttccattcct ccgtttctcg tagtagcgcg ctccgatctg tgggtggatc tgggtgatcc 1380
tggggtgtgg ttcgttctgt ttgatagatc tctcgggtga tctggccttc tgtggttgtc 1440
gatgtccgga tctgcgtttt gatcagtggt agttcgtgga tctggcgaaa tgttttggat 1500
ctggcagtgga gacgctaaga atcgggaaat gatgcaatat tagggggggt tccgatgggg 1560
atccactgaa ttagtctgtc tcctgctga taatctgttc ctttttgga gatctgggta 1620
gtgtatgttt gtttcggata gatctgatca atgcttgttt gtttttcaa attttctacc 1680
taggttgat aggaatggca tgcggatctg gttggattgc catgatccgt gctgaaatgc 1740
ccctttgggt gatggatctt gatattttac tgctgttcac cttagattgt actcccgttt 1800
atacttaatt tgttgcttat tatgaataga tctgtaactt aggcacatgt atggacggag 1860
tatgtggatc tgtagtatgt acattgctgc gagctaagaa ctatttcaga gcaagcacag 1920
aaaaaaatat ttagacagat tgggcaacta tttgatggtc tttggatca tgctttgtag 1980
tgctcgtttc tgcgtagtaa tcttttgatc tgatctgaag ataggtgcta ttatattctt 2040
aaaggtcatt agaacgctat ctgaaaggct gtattatgtg gattggttca cctgtgactc 2100
cctgttcgtc ttgtcttgat aaatcctgtg ataaaaaaaa ttcttaaggc gtaatttgtt 2160
gaaatcttgt tttgtcctat gcagcctgat 2190

<210> 2
<211> 1206
<212> ADN
<213> *Oryza sativa*
<400> 2

5

ES 2 609 428 T3

gcctcgagac aacaacatgc ttctcatcaa catggaggga agagggaggg agaaaagtgc 60
gcctggtcac ctccattgtc aactagcca ctggccagct ctcccacacc accaatgcca 120
ggggcgagct ttagcacagc caccgcttca cctccaccac cgcactaccc tagcttcgcc 180
caacagccac cgtcaacgcc tcctctccgt caacataaga gagagagaga agaggagagt 240
agccatgtgg ggaggaggaa tagtacatgg ggcctaccgt ttggcaagtt attttgggtt 300
gccaaagttag gccaaataagg ggaggggattt ggccatccgg ttggaaaggt tattggggta 360
gtatcttttt actagaattg tcaaaaaaaaa atagtttgag agccatttgg agaggatggt 420
gcctgttaga ggtgctctta ggacatcaaa ttccataaaa acatcagaaa aattctctcg 480
atgaagattt ataaccacta aaactgccct caattcgaag ggagttcaaa acaattaaaa 540
tcatgttcga attgagtttc aatttcaact taacccttt gaaatctcaa tggtaaaaca 600
tcaaccgctc aggtagcatg gttcttttta ttcttttcaa aaagagttaa ttacaaacag 660
aatcaaaact aacagttagg cccaaggccc atccgagcaa acaatagatc atgggcccagg 720
cctgccacca cctccccct cctggctccc gctcttgaat ttcaaaatcc aaaaatatcg 780
gcacgactgg cgcgcgacgg agcggggcga aatgacgga acaaccctc gaattctacc 840
ccaactacgc ccaccaacc acacgccact gacaatccgg tcccaccctt gtgggcccac 900
ctacaagcga gacgtcagtc gctcgcagca accagtgggc ccacctccca gtgagcggcg 960
ggtagatctg gactcttacc caccacact aaacaaaacg gcatgaatat tttgactaa 1020
aacctcaga aaaattcga tattccaaac cagtacagtt cctgaccgtt ggaggagcca 1080
aagtggagcg gagtgtaaaa ttgggaaact taatcgaggg ggttaaaccg aaaaacgccg 1140
aggcgcctcc cgctctatag aaaggggagg agtgggaggt ggaaacccta ccacaccgca 1200
gagaaa 1206

<210> 3
<211> 582
<212> ADN
<213> *Oryza sativa*
<400> 3

5

ES 2 609 428 T3

cagggttcct gectggtgcc ttggcaatgc ttgattactg ctgctatcct atgatctgtc 60
 cgtgtgggct tctatctatc agtttgtgtg tctggttttg aaaaacattt gcttttcgat 120
 tatgtagggg ttgctttagc ctttcgctgc tgtgacctgt gttgtttatg tgaaccttct 180
 ttgtggcacc tttaatatcc aagttcgtgg tttgtcgtaa aacgaagcct ctacttcgta 240
 aagttgtgtc tatagcattg aaatcgtttt tttgctcgag aataattgtg acctttagtt 300
 ggcgtgaaac tagttttgga tatctgattc tctggttcgc aatcttgaga tcgtcgcctgc 360
 ttaggtgagc taagtgatgt tccctaagtaa atgctcctca ccagaatagc tagctgtgtg 420
 aaaagagaac gcgtgaatac gtagctgtgt aaagattgtg tcccaagtaa acctcagtga 480
 tttttgtttg gatttttaat ttagaaacat tcgactggga gcggctagag ccacacccaa 540
 gttcctaact atgataaagt tgctctgtaa cagaaaacac ca 582

5

<210> 4
 <211> 892
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

<400> 4

gtaaaacaaa caaaaacgga tctgatgctt ccattcctcc gtttctcgta gtagcgcgct 60
 tcgatctgtg ggtggatctg ggtgatcctg ggggtgtggtt cgttctgltt gatagatctg 120
 tcgggtggatc tggccttctg tggttgtcga tgtccggatc tgcgttttga tcagtggtag 180
 ttcgtggatc tggcgaaatg ttttggatct ggcagtgaga cgctaagaat cgggaaatga 240
 tgcaatatta ggggggtttc ggatggggat ccactgaatt agtctgtctc cctgctgata 300
 atctgttctt ttttggtaga tctggttagt gtatgtttgt ttcggataga tctgatcaat 360
 gcttgtttgt tttttcaaat tttctaccta ggttgtatag gaatggcatg cggatctggt 420
 tggattgcca tgatccgtgc tgaaatgccc ctttggttga tggatcttga tattttactg 480
 ctgttcacct agatttgtac tcccgtttat acttaatttg ttgcttatta tgaatagatc 540
 tgtaacttag gcacatgtat ggacggagta tgtggatctg tagtatgtac attgctgcga 600
 gctaagaact atttcagagc aagcacagaa aaaaatattt agacagattg ggcaactatt 660
 tgatggtctt tggatcatg ctttgtagtg ctcgtttctg cgtagtaatc ttttgatctg 720
 atctgaagat aggtgctatt atattcttaa aggtcattag aacgctatct gaaaggctgt 780
 attatgtgga ttggttcacc tgtgactccc tgttcgtctt gtcttgataa atcctgtgat 840
 aaaaaaatt ctttaaggcgt aatttgttga aatcttgttt tgtcctatgc ag 892

10

<210> 5
 <211> 86
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

15

ES 2 609 428 T3

<400> 5
 gggtctctcg tactcgctc tctcgegecc ctctctccgcc geegetegcc geegtctgctc 60
 tccgccgcca ccggttagcc atccag 86

5 <210> 6
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico sintético

<400> 6
 gacaagcttg cctcgagaca acaacatgct tc 32

15 <210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico sintético

<400> 7
 attccatggc ggctagccgg tggcggcgga gacgaacg 38

25 <210> 8
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico sintético

<400> 8
 cgagctagcc atccaggtaa aacaacaaa aacggatct 39

35 <210> 9
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico sintético

45 <400> 9
 attccatgga tcaggctgca taggacaaaa caag 34

50 <210> 10
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico sintético

<400> 10
 tagagagctc cagggttctt gcctggtgcc ttg 33

60 <210> 11
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico sintético

5

<400> 11

acttctagat ggtgtttct gttacagagc aac 33

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ADN que comprende un promotor, unido de forma funcional a una molécula polinucleotídica que se puede transcribir, unida de forma funcional a una molécula de terminación de la transcripción 3' que comprende la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 3.
- 5 2. La construcción de ADN de la reivindicación 1, en la que dicha molécula polinucleotídica que se puede transcribir es un gen marcador.
3. La construcción de ADN de la reivindicación 1, en la que dicha molécula polinucleotídica que se puede transcribir es un gen de interés agronómico.
- 10 4. La construcción de ADN de la reivindicación 3, en la que dicho gen de interés agronómico es un gen de tolerancia a herbicidas seleccionado de genes que codifican fosfinotricina acetiltransferasa, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa resistente a glifosato, hidroxifenil piruvato deshidrogenasa, dalapon deshalogenasa, nitrilasa resistente a bromoxinil, antranilato sintasa, glifosato oxidorreductasa y glifosato-N-acetil transferasa.
5. Una planta transgénica que comprende la construcción de ADN de la reivindicación 1.
- 15 6. La planta transgénica de la reivindicación 5, en la que dicha planta es una monocotiledónea seleccionada de trigo, maíz, centeno, arroz, avena, cebada, césped, sorgo, mijo y caña de azúcar.
7. La planta transgénica de la reivindicación 5, en la que dicha planta es una planta dicotiledónea seleccionada de tabaco, tomate, patata, soja, algodón, canola, girasol y alfalfa.
8. Una semilla de dicha planta transgénica de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que comprende la construcción de ADN de la reivindicación 1.
- 20 9. Un procedimiento de inhibición del crecimiento de malas hierbas en un campo de plantas transgénicas de cultivo tolerantes a glifosato, que comprende:
 - (i) plantar las plantas transgénicas transformadas con un casete de expresión que comprende un promotor, unido de forma funcional a una molécula de ADN que codifica un gen de tolerancia a glifosato, unido de forma funcional a una molécula de terminación de la transcripción 3' que comprende la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 3, y
 - 25 (ii) aplicar glifosato al campo a una tasa de aplicación que inhibe el crecimiento de malas hierbas,

en el que el crecimiento y el rendimiento de la planta transgénica de cultivo no se ven sustancialmente afectados por la aplicación de glifosato.
- 30 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho gen de tolerancia a glifosato se selecciona de un gen que codifica una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa resistente a glifosato, una glifosato oxidorreductasa y una glifosato-N-acetil-transferasa.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que las plantas transgénicas son capaces de tolerar una tasa de aplicación máxima 17,93 kg/ha.
- 35 12. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que las plantas transgénicas son capaces de tolerar una tasa de aplicación que varía de 0,56 a 8,97 kg/ha.
13. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que las plantas transgénicas son capaces de tolerar una tasa de aplicación que varía de 2,24 a 6,72 kg/ha.
14. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la aplicación de glifosato es al menos una vez durante el crecimiento del cultivo.

40

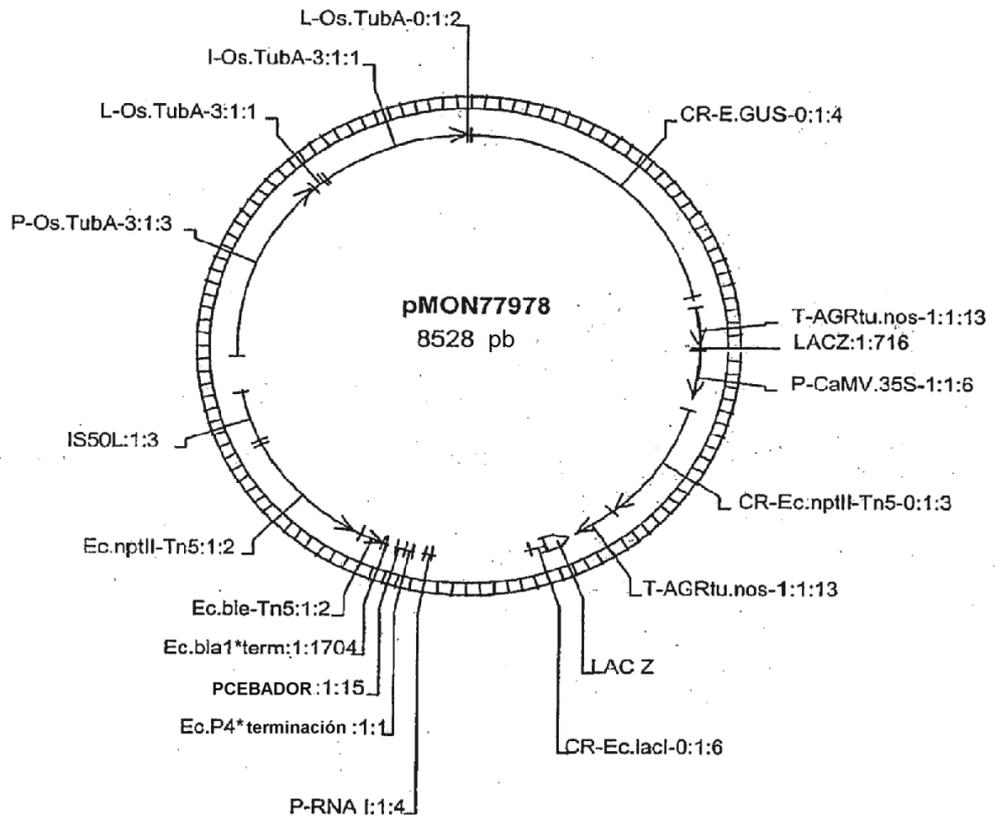


Figura 1

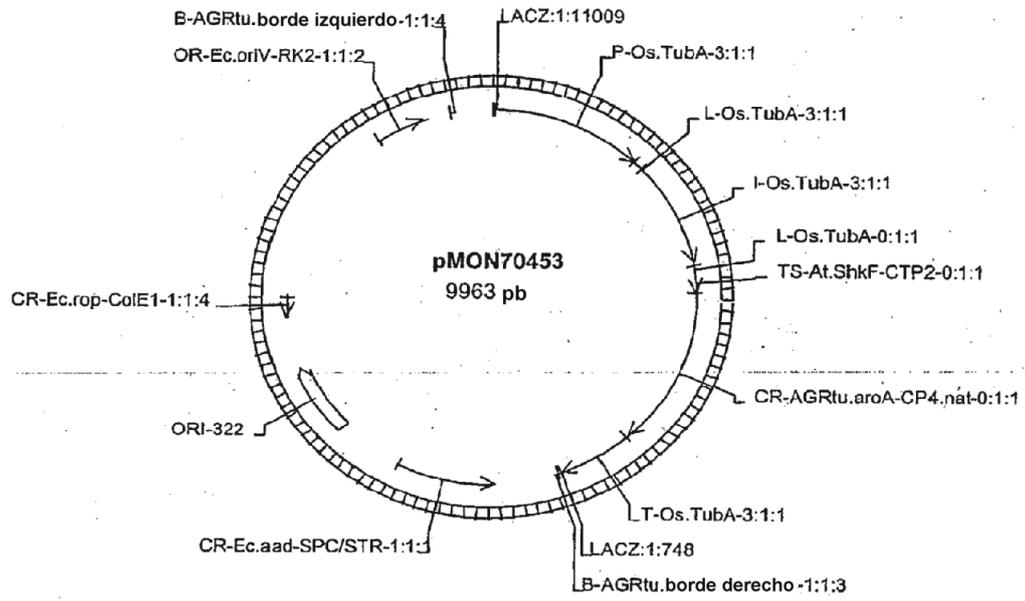


Figura 2