

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 276**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

A01H 5/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2010 PCT/US2010/038271**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010 WO10144775**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2010 E 10786895 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2440035**

54 Título: **Un método para la expresión transitoria de ácidos nucleicos en plantas**

30 Prioridad:

11.06.2009 US 186025 P

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

13.07.2017

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)
Schwarzwaldallee 215
4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

AZHAKANANDAM, KASI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 624 276 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

Un método para la expresión transitoria de ácidos nucleicos en plantas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere generalmente a plantas transgénicas. Más específicamente, se refiere a métodos y composiciones de expresión de transgenes en plantas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Los avances en la biología molecular han potenciado la capacidad de los científicos para manipular el genoma de animales y plantas. Pueden identificarse y aislarse genes que controlan diversos aspectos de los procesos moleculares de plantas y animales a partir de los genomas de aquellos organismos respectivos. Por ejemplo, se han aislado genes que confieren resistencia a antibióticos, herbicidas e insectos, o sequía, de diversos organismos. Es incluso más importante la capacidad de coger un gen aislado de un organismo e introducir dicho gen en otro organismo (transformación heteróloga). Esta integración puede llevarse a cabo incluso donde el organismo receptor sea de un filo, género o especie diferente del que derivó el gen.

15 Generalmente, la transformación de plantas se basa en dos enfoques para el suministro y expresión de genes extraños en plantas: transformación genética estable y expresión transitoria. Se han empleado varias técnicas de ingeniería genética para introducir establemente los rasgos deseados en genomas de planta. La introducción de estos rasgos deseados se ha llevado a cabo por medios que incluyen infección por *Agrobacterium* (Nester *et al.*, 1984), captación de ADN mediada por polietilenglicol (PEG) (Lorz *et al.*, 1985), electroporación de protoplastos (Fromm *et al.*, 1986) y bombardeo con microproyectiles (Klein *et al.*, 1987). Muchas especies de plantas pueden ahora transformarse establemente rutinariamente usando los métodos anteriormente mencionados o variantes de los mismos (para una revisión véase: Christou *et al.*, 1996, Trends Plant Sci. 1, 423-431). La expresión transitoria en plantas puede llevarse a cabo mediante agro-infiltración, bombardeo con partículas o infección viral (para una revisión véase: Fischer *et al.*, 1999, Biotechnol. Appl. Biochem., 30, 113-116; véase también Song *et al.*, 2003, Plant Biotech., 20, 235-239).

25 La expresión transitoria de ácidos nucleicos tiene un gran potencial como un medio para predecir cuántos genes, promotores, casetes de expresión, u otros elementos, podrían rendir en una planta transgénica estable. Es altamente deseable el desarrollo de un ensayo *in planta* de expresión transitoria para permitir la rápida evaluación de la expresión de genes heterólogos en plantas. El establecimiento y la caracterización convencionales de una línea de planta transgénica estable implica un largo proceso que frecuentemente dura más de dos años. Sería ideal tener un método de ensayo transitorio rápido para evaluar rápidamente cómo un casete de expresión y o sus elementos asociados (es decir, promotor, gen, potenciadores) rendirán en líneas de planta estables. Por ejemplo, sería ideal tener un método transitorio donde pudiera correlacionarse rápidamente usando datos transitorios el mejor método de expresión (es decir, direccionamiento celular, combinaciones de potenciador, selección de promotores, etc.) para ser empleado en líneas de planta estables. Este método también podría utilizarse para identificar rápidamente problemas de expresión tales como escisión de proteínas, toxicidad de tejido, fenotipos desfavorables, además de otros problemas que pudieran identificarse antes de invertir tiempo y recursos para expresar candidatos a gen en líneas de planta estables. La expresión transitoria puede lograrse agro-infiltrando tejido de planta con un casete de expresión estándar bajo el control de un promotor constitutivo tal como el promotor 35S para conducir la expresión del gen de interés (Vaquero *et al.*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 96, 11128-11133). Una desventaja de expresar transitoriamente genes de interés usando el método de agro-infiltración es que el método produce niveles de expresión de proteínas muy bajos. La baja expresión de proteínas dificulta correlacionar cómo un gen o casete de expresión podría rendir establemente *in planta*. Se ha encontrado que la inclusión de supresores del silenciamiento génico post-transcripcional en agro-infiltración, tales como p19 o HcPro, produce un aumento de 50 veces en la proteína expresada transitoria (Voinnet *et al.*, 2003, Plant J., 33, 549-556). Aunque los niveles de expresión de proteína transitoria son más altos, la expresión transitoria agro-infiltrada empleando supresores de silenciamiento génico post-transcripcionales puede en algunos casos ser incoherente con respecto a la expresión de proteínas y no en absoluto predictivos de cómo un gen o casete de expresión dado podría rendir en plantas estables. También pueden usarse vectores virales para expresar transitoriamente proteínas de interés. Los vectores virales vencen el problema de producir altos niveles de expresión transitoria (para una revisión véase: Porta & Lomonosoff, 1996, Mol. Biotechnol., 5, 209-221; Yusibov *et al.*, 1999, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 240 81-94). Sin embargo, el uso de vectores virales para expresar transitoriamente una proteína en plantas está limitado por un estrecho intervalo de huéspedes en términos de su mejor rendimiento, además de limitaciones al tamaño del gen. También está el problema de que no se ha identificado método de ensayo transitorio que funcione coherentemente a través de una variedad de especies de planta. Las monocotiledóneas son un grupo de plantas especialmente difícil de expresar coherentemente genes de interés transitoriamente de un modo que puedan usarse datos transitorios como indicador predictivo de cómo un gen o casete de expresión puede rendir en líneas de planta estables. De particular interés, sería un método de ensayo *in planta* de expresión transitoria que podría funcionar en cultivos de cereales (por ejemplo, maíz o trigo), caña de azúcar, remolacha azucarera, soja, arroz, además de otros cultivos comercialmente importantes.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan composiciones y métodos para expresar transitoriamente proteínas en una planta. Las composiciones comprenden plantas, semillas, tejidos de planta y partes de planta que expresan una proteína, en las que la proteína se expresa transitoriamente y la expresión transitoria de la proteína puede usarse como modelo predictivo de cómo dicha proteína se expresará en plantas transgénicas estables con respecto a datos cualitativos y cuantitativos. El modelo predictivo puede usarse, pero no se limita a: evaluación de promotores, evaluación de la construcción de casetes de expresión para el mejor rendimiento (por ejemplo, adición de potenciadores o supresores del silenciamiento génico), evaluación de las mejores formas para expresar genes heterólogos (por ejemplo, mutaciones puntuales, direccionamiento), evaluación rápida de la inactivación de genes endógenos, evaluación de los niveles de expresión de proteínas, direccionamiento celular, direccionamiento de tejidos, potenciadores transcripcionales, toxicidad de proteínas potenciadoras de la traducción y perfilado metabólico. Además, se proporcionan métodos de uso.

Usos aguas abajo del método de ensayo transitorio que comprenden los métodos descritos en el presente documento incluyen usos agronómicos, farmacéuticos e industriales, por ejemplo, alimento humano, pienso para animales, biocombustible, alcohol industrial, materias primas de fermentación, y similares.

Estas y otras características, objetivos y ventajas de la presente invención llegarán a entenderse mejor a partir de la descripción que sigue. Por tanto, debe hacerse referencia a las reivindicaciones citadas en el presente documento para interpretar el alcance de la invención.

DEFINICIONES

Debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología particular, protocolos, líneas celulares, especies de planta o géneros, construcciones y reactivos descritos como tales. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solo, y no pretende limitar el alcance de la presente invención. Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "y", "el" y "la" incluyen referencia al plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a "un vector" es una referencia a uno o más vectores e incluye equivalentes de los mismos conocidos para aquellos expertos en la materia.

El término "aproximadamente" se usa en el presente documento para significar aproximadamente, alrededor de o en la región de. Cuando el término "aproximadamente" se usa conjuntamente con un intervalo numérico, modifica ese intervalo, extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. En general, el término "aproximadamente" se usa en el presente documento para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido por una diferencia del 20 por ciento.

Como se usa en el presente documento, la palabra "o" significa una miembro cualquiera de una lista particular y también incluye cualquier combinación de miembros en esa lista.

"Inhibición antisentido" se refiere a la producción de transcritos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de proteína de un gen endógeno o un transgén.

"Elemento en cis" se refiere a un elemento regulador de la transcripción que actúa en cis que confiere un aspecto del control global de la expresión génica. Un elemento en cis puede funcionar uniéndose a factores de transcripción, factores de proteína que actúan en trans que regulan la transcripción. Algunos elemento en cis se unen a más de un factor de transcripción, y los factores de transcripción pueden interactuar con diferentes afinidades con más de un elemento en cis. Los elemento en cis pueden identificarse por varias técnicas, que incluyen análisis de deleciones, es decir, deleccionar uno o más nucleótidos del extremo 5' o internos a un promotor; análisis de proteínas de unión de ADN usando huella de DNasa I, interferencia de metilación, ensayos de desplazamiento de la movilidad por electroforesis, huella genómica *in vivo* por PCR mediada por ligación, y otros ensayos convencionales; o por análisis de similitud de secuencias de ADN con motivos de elementos en cis conocidos por métodos de comparación de secuencias de ADN convencionales. La estructura fina de un elemento en cis puede estudiarse además por mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o por otros métodos convencionales. Los elementos en cis pueden obtenerse por síntesis química o por aislamiento de promotores que incluyen tales elementos, y pueden sintetizarse con nucleótidos flanqueantes adicionales que contienen sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar la manipulación de subsecuencias.

"Quimérico" se usa para indicar que una secuencia de ADN, tal como un vector o un gen, comprende dos o más secuencias de ADN de origen distinto que están fusionadas juntas por técnicas de ADN recombinante, produciendo una secuencia de ADN, que no se produce naturalmente.

"Cromosómicamente integrado" se refiere a la integración de un gen extraño o construcción de ADN en el ADN huésped por enlaces covalentes. Donde los genes no están "cromosómicamente integrados", pueden estar "transitoriamente expresados". La expresión transitoria de un gen se refiere a la expresión de un gen que no está integrado en el cromosoma del huésped, pero funciona independientemente, bien como parte de un plásmido

autónomamente replicante o casete de expresión, por ejemplo, o bien como parte de otro sistema biológico tal como un virus.

5 "Secuencia codificante" se refiere a una secuencia de ADN o ARN que codifica una secuencia de aminoácidos específica y excluye las secuencias no codificantes. Puede constituir una "secuencia codificante no interrumpida", es decir, que carece de un intrón, tal como en un ADNc, o puede incluir uno o más intrones limitados por uniones de corte y empalme apropiadas. Un "intrón" es una secuencia de ARN que está contenida en el transcrito primario, pero que se elimina mediante escisión y re-ligación, o corte y empalme, del ARN dentro de la célula para crear el ARNm maduro que puede traducirse en una proteína.

10 "Promotor constitutivo" se refiere a un promotor que es capaz de expresar el gen que controla todos o casi todos los tejidos de planta durante todas o casi todas las etapas de desarrollo de la planta, generando así la "expresión constitutiva" del gen.

"Co-supresión" y "supresión de sentido" se refieren a la producción de transcritos de ARN sentido capaces de suprimir la expresión de transgén idéntico o sustancialmente idéntico o genes endógenos.

15 "Contiguo" se usa en el presente documento para significar secuencias de ácidos nucleicos que son inmediatamente precedentes o siguen a otra.

"Expresión" se refiere a la transcripción y acumulación estable de ARNm. La expresión puede también referirse a la producción de proteína.

20 "Casete de expresión", como se usa en el presente documento, significa una secuencia de ADN capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula huésped apropiada, que comprende un promotor operativamente unido a la secuencia de nucleótidos de interés que está operativamente unido a señales de terminación. También comprende normalmente secuencias requeridas para la apropiada traducción de la secuencia de nucleótidos. La región codificante normalmente codifica una proteína de interés, pero también puede codificar un ARN funcional de interés, por ejemplo ARN antisentido o un ARN no traducido, en la dirección sentido o antisentido. El casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico, que significa que
25 al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes.

El "patrón de expresión" de un promotor (con o sin un potenciador) es el patrón de expresión que muestra dónde en la planta y en qué estadio de desarrollo el promotor inicia la transcripción. Se dice que los patrones de expresión de un conjunto de promotores son complementarios cuando el patrón de expresión de un promotor muestra poco solapamiento con el patrón de expresión del otro promotor.

30 "Gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm, ARN funcional, o proteína específica, que incluye secuencias reguladoras. El término "gen nativo" se refiere a un gen como se encuentra en la naturaleza. El término "gen quimérico" se refiere a cualquier gen que contiene 1) secuencias de ADN, que incluyen secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza o 2) secuencias que codifican partes de proteínas no naturalmente contiguas, o 3) partes de promotores que no son naturalmente contiguos. Por
35 consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se derivan de diferentes fuentes, o comprenden secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de un modo diferente al encontrado en la naturaleza. Un "transgén" se refiere a un gen que se ha introducido en el genoma por transformación y se mantiene establemente. Los transgenes pueden incluir, por ejemplo, genes que son tanto heterólogos como homólogos a los genes de una planta particular que va a transformarse. Adicionalmente, los transgenes pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no
40 nativo, o genes quiméricos. El término "gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen "extraño" se refiere a un gen no normalmente encontrado en el organismo huésped, sino uno que se introduce en el organismo por transferencia génica.

45 Una secuencia de ácidos nucleicos "aislada" está sustancialmente separada o purificada de otras secuencias de ácidos nucleicos con las que el ácido nucleico normalmente está asociado en la célula del organismo en la que el ácido nucleico naturalmente se produce, es decir, otro ADN cromosómico o extracromosómico. El término engloba ácidos nucleicos que se purifican bioquímicamente de manera que eliminen sustancialmente ácidos nucleicos contaminantes y otros componentes celulares. El término también engloba ácidos nucleicos recombinantes y ácidos nucleicos químicamente sintetizados. El término "sustancialmente purificado", como se usa en el presente
50 documento, se refiere a una molécula separada de otras moléculas normalmente asociadas a ella en su estado nativo. Más preferentemente, una molécula sustancialmente purificada es la especie predominante presente en una preparación. Una molécula sustancialmente purificada puede estar más del 60 % libre, preferentemente el 75 % libre, más preferentemente el 90 % libre, de las otras moléculas (sin incluir disolvente) presentes en la mezcla natural. El término "sustancialmente purificado" no pretende englobar moléculas presentes en su estado nativo.

55 Puede diseñarse y sintetizarse químicamente una "secuencia de ácidos nucleicos sintética" para la expresión potenciada en células huésped particulares y para los fines de clonación en construcciones apropiadas. Las células huésped frecuentemente muestran un patrón preferido de uso de codones (Murray *et al.*, 1989). Los ADN sintéticos diseñados para potenciar la expresión en un huésped particular deben, por tanto, reflejar el patrón de uso de

codones en la célula huésped. Están disponibles programas informáticos para estos fines que incluyen, pero no se limitan a, Vector NTI Advanced Software Package Release 10.0, Invitrogen, Carlsbad California.

5 "Silenciamiento génico" se refiere a la supresión dependiente de homología de genes virales, transgenes o genes nucleares endógenos. El silenciamiento génico puede ser transcripcional, cuando la supresión es debida a la reducida transcripción de los genes afectados, o post-transcripcional, cuando la supresión es debido a la elevada renovación (degradación) de especies de ARN homólogas a los genes afectados (English, et al., 1996, Plant Cell 8:179-1881). El silenciamiento génico incluye silenciamiento génico inducido por virus (Ruiz et al., 1998, Plant Cell 10:937-946).

10 "Genéticamente estable" y "heredable" se refieren a elementos genéticos cromosómicamente integrados que son establemente mantenidos en la planta y establemente heredados por la progenie mediante generaciones sucesivas.

"Secuencia de ADN heterólogo" es una secuencia de ADN no naturalmente asociada a una célula huésped en la que se introduce, que incluye múltiples copias que no existen de forma natural de una secuencia de ADN que existe de forma natural.

15 "Promotor inducible" se refiere a aquellos promotores regulados que pueden convertirse en uno o más tipos de células por un estímulo externo, tal como una sustancia química, luz, hormona, estrés, o un patógeno.

"Insecticidas" se define como una actividad biológica tóxica capaz de controlar insectos, preferentemente destruyéndolos.

20 "Secuencia no codificante 5'" se refiere a una secuencia de nucleótidos localizada 5' (en la dirección 5') con respecto a la secuencia codificante. Está presente en el ARNm completamente procesado en la dirección 5' del codón de iniciación y puede afectar el procesamiento del transcrito primario a ARNm, estabilidad de ARNm o eficiencia de traducción (Turner et al., 1995, Molecular Biotechnology, 3:225).

25 "Secuencia no codificante 3'" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas 3' (en la dirección 3') con respecto a una secuencia codificante e incluyen secuencias de señal de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar el procesamiento de ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza normalmente por afectar la adición de extensiones de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. El uso de diferentes secuencias no codificantes 3' se ejemplifica por Ingelbrecht et al. (1989, Plant Cell, 1:671-680).

30 El término "ácido nucleico" se refiere a un polinucleótido de alto peso molecular que puede ser monocatenario o bicatenario, compuesto de monómeros (nucleótidos) que contienen un azúcar, fosfato y una base que es tanto una purina como pirimidina. Un "fragmento de ácido nucleico" es una fracción de una molécula de ácido nucleico dada. En plantas superiores, el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el material genético, mientras que el ácido ribonucleico (ARN) participa en la transferencia de información contenida dentro de ADN en proteínas. Un "genoma" es el cuerpo entero de material genético contenido en cada célula de un organismo. El término "secuencia de nucleótidos" se refiere a un polímero de ADN o ARN que puede ser mono- o bicatenario, que contiene opcionalmente bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas capaces de incorporación en polímeros de ADN o ARN.

35 Los términos "marco de lectura abierto" y "ORF" se refieren a la secuencia de aminoácidos codificada entre los codones de iniciación y de terminación de la traducción de una secuencia codificante. Los términos "codón de iniciación" y "codón de terminación" se refieren a una unidad de tres nucleótidos adyacentes ('codón') en una secuencia codificante que especifica la iniciación y terminación de cadena, respectivamente, de la síntesis de proteínas (traducción de ARNm).

40 "Operablemente unidas" y "operativamente unidas" se refiere a la asociación de secuencias de ácidos nucleicos en un único fragmento de ácido nucleico de manera que la función de una se afecte por la otra. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante o ARN funcional cuando es capaz de afectar la expresión de esa secuencia codificante o ARN funcional (es decir, que la secuencia codificante o ARN funcional está bajo el control de la transcripción del promotor). Secuencias codificantes en orientación sentido o antisentido pueden estar operativamente unidas a secuencias reguladoras.

45 "Expresión en exceso" se refiere al nivel de expresión en organismos transgénicos que supera los niveles de expresión en organismos normales o no transformados.

50 "Tejido de planta" incluye tejidos o plantas diferenciados y no diferenciados, que incluyen, pero no se limitan a, raíces, tallos, brotes, hojas, polen, semillas, tejido tumoral y diversas formas de células y cultivo tal como células individuales, protoplasto, embriones y tejido de callo. El tejido de planta puede estar en plantas o en órgano, tejido o cultivo celular.

"Expresión preferida", "transcripción preferencial" o "transcripción preferida" se refieren indistintamente a la expresión de productos génicos que se expresan preferentemente a un nivel más alto en uno o algunos tejidos de

planta (limitación espacial) y/o a uno o algunos estadios de desarrollo de la planta (limitación temporal), mientras que en otros tejidos/estadios de desarrollo hay un nivel relativamente bajo de expresión.

5 "Transformante primario" y "generación T0" se refieren a plantas transgénicas que son de la misma generación genética que el tejido que se transformó inicialmente (es decir, que no han pasado por meiosis y fecundación desde la transformación). "Transformantes secundarios" y las "generaciones T1, T2, T3, etc." se refieren a plantas transgénicas derivadas de transformantes primarios mediante uno o más ciclos meióticos y de fecundación. Pueden derivarse por auto-fecundación de transformantes primarios o secundarios o cruces de transformantes primarios o secundarios con otras plantas transformadas o no transformadas.

Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente en el presente documento.

10 "Promotor" o "secuencia de nucleótidos reguladora de la transcripción" se refiere a una secuencia de nucleótidos que controla la expresión de una secuencia codificante proporcionando el reconocimiento para ARN polimerasa y otros factores requeridos para la apropiada transcripción. "Secuencias reguladoras de promotor" pueden comprender elementos en la dirección 5' y/o elementos en la dirección 3' proximales y más distales. Las secuencias reguladoras de promotor influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad de ARN, o la traducción de la secuencia codificante asociada. Secuencias reguladoras incluyen potenciadores, secuencias conductoras no traducidas, intrones, exones y secuencias de señal de poliadenilación. Incluyen secuencias naturales y sintéticas, además de secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Un "potenciador" es una secuencia de nucleótidos que puede estimular la actividad de promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o especificidad de tejido de un promotor. La secuencia primaria puede estar presente en cualquier hebra de una molécula de ADN bicatenario, y es capaz de funcionar incluso cuando se pone tanto en la dirección 5' como en la dirección 3' del promotor. El significado del término "promotor" incluye "secuencias reguladoras de promotor".

25 "Secuencia de referencia", como se usa en el presente documento, se define como una secuencia que se usa como base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, como un fragmento de una secuencia de ADNc o de gen de longitud completa, o la secuencia de ADNc o de gen de longitud completa.

30 "Promotor regulado" se refiere a promotores que dirigen la expresión génica no constitutivamente, sino de una manera temporal y/o espacialmente regulada, e incluyen tanto promotores específicos de tejido como inducibles. Incluye secuencias naturales y sintéticas, además de secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos de células, o en diferentes estadios de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones medioambientales.

35 "Secuencias reguladoras" y "secuencias reguladoras adecuadas" se refieren cada uno a secuencias de nucleótidos localizadas en la dirección 5' (secuencias no codificantes 5'), dentro de, o en la dirección 3' (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad de ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Secuencias reguladoras incluyen potenciadores, promotores, secuencias de potenciador de la traducción, intrones y secuencias de señal de poliadenilación. Incluyen secuencias naturales y sintéticas, además de secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales.

40 El término "transcrito de ARN" se refiere al producto resultante de la transcripción catalizada por ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, se denomina el transcrito primario o puede ser una secuencia de ARN derivada por procesamiento post-transcripcional del transcrito primario y se denomina el ARN maduro. "ARN mensajero" (ARNm) se refiere al ARN que es sin intrones y que puede ser traducido en proteína por la célula. "ADNc" se refiere a un ADN mono- o bicatenario que es complementario a y se deriva de ARNm. Un "ARN funcional" se refiere a un ARN antisentido, ribozima, u otro ARN que no se traduce, pero participa en una reacción o proceso como un ARN.

50 "Intrón" se refiere a una sección intermedia de ADN que se produce casi exclusivamente dentro de un gen eucariota, pero que no se traduce a secuencias de aminoácidos en el producto génico. Los intrones se eliminan del ARNm pre-maduro mediante un proceso llamado corte y empalme, que une los exones para formar un ARNm. Para los fines de la materia presentemente desvelada, la definición del término "intrón" incluye modificaciones a la secuencia de nucleótidos de un intrón derivado de un gen diana.

"Exón" se refiere a una sección de ADN que lleva la secuencia codificante para una proteína o parte de ella. Los exones se separan por secuencias no codificantes intermedias (intrones). Para los fines de la materia presentemente desvelada, la definición del término "exón" incluye modificaciones a la secuencia de nucleótidos de un exón derivada de un gen diana.

55 Un "gen marcador de selección" se refiere a un gen cuya expresión en una célula de planta da a la célula una ventaja selectiva. La ventaja selectiva poseída por las células transformadas con el gen marcador de selección puede ser debida a su capacidad para crecer en presencia de un agente selectivo negativo, tal como un antibiótico o un herbicida, en comparación con la capacidad para crecer de células no transformadas. La ventaja selectiva

poseída por las células transformadas también puede ser debida a su capacidad potenciada, con respecto a células no transformadas, para utilizar un compuesto añadido como nutriente, factor de crecimiento o fuente de energía. Una ventaja selectiva poseída por una célula transformada también puede ser debido a la pérdida de un gen previamente poseído en lo que se llama "selección negativa". En esto, se añade un compuesto que es tóxico solo para células que no perdieron un gen específico (un gen marcador de selección selectivo) presente en la célula parental (normalmente un transgén).

"Expresión específica" es la expresión de productos génicos que está limitada a uno o algunos tejidos de planta (limitación espacial) y/o a uno o algunos estadios de desarrollo de planta (limitación temporal).

Sustancialmente idénticas: la expresión "sustancialmente idénticas", en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o de proteínas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos el 60 %, preferentemente el 80 %, más preferentemente el 90, incluso más preferentemente el 95 %, y lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad de restos de nucleótidos o de aminoácidos, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima, como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual. Preferentemente, la identidad sustancial existe a lo largo de una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 50 restos de longitud, más preferentemente a lo largo de una región de al menos aproximadamente 100 restos, y lo más preferentemente las secuencias son sustancialmente idénticas a lo largo de al menos aproximadamente 150 restos. En una realización especialmente preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas a lo largo de la longitud entera de las regiones codificantes. Además, secuencias de ácidos nucleicos o de proteínas sustancialmente idénticas realizan sustancialmente la misma función.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa de una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Si se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se entran en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan parámetros de programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencias para la(s) secuencia(s) de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa designados. Aquellos expertos en la materia entienden que para evitar una alta similitud con una secuencia de referencia debido a la inclusión de huecos en la secuencia de polinucleótidos, normalmente se introduce una penalización por hueco y se resta del número de coincidencias.

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48: 443 (1970), por la búsqueda por el método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444 (1988), por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual (véase generalmente Ausubel *et al.*, abajo).

Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencias es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410. El software para realizar los análisis BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional para Información Biotecnológica. Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda, que tanto se corresponden como satisfacen alguna puntuación T de umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, 1990). Estos aciertos iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. Los aciertos de palabra se extienden entonces en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia para que, en la medida de lo posible, pueda aumentarse la puntuación acumulada de alineación. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos de correspondencia; siempre >0) y N (puntuación de penalización para restos de no correspondencia; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando la puntuación acumulada de alineación cae fuera por la cantidad X de su valor máximo logrado, la puntuación acumulada va a cero o por debajo debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de puntuación negativa, o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, un corte de 100, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM 62 (véase Henikoff & Henikoff, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencias, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, 1993, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se producirá por casualidad una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia de ácidos

nucleicos de prueba se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación de la secuencia de ácidos nucleicos de prueba con la secuencia de ácidos nucleicos de referencia es menos de aproximadamente 0,1, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01, y lo más preferentemente menos de aproximadamente 0,001.

5 Para los fines de la presente invención, la comparación de secuencias de nucleótidos para la determinación del porcentaje de identidad de secuencia con las secuencias promotoras desveladas en el presente documento se hace preferentemente usando el programa BLASTN (versión 1.4.7 o posterior) con sus parámetros por defecto o cualquier programa equivalente. Por "programa equivalente" está previsto cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualquiera en cuestión, genere un alineamiento que tiene coincidencias de restos de
10 nucleótidos o de aminoácidos idénticas y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico cuando se compara con el alineamiento correspondiente generado por el programa preferido.

Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí bajo condiciones de hibridación rigurosas. La expresión "hibridar específicamente con" se refiere a la unión, duplexado o hibridación de una molécula solo con una secuencia de nucleótidos particular bajo
15 condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, celular total) de ADN o ARN. "Se une(n) sustancialmente" se refiere a hibridación complementaria entre un ácido nucleico de sonda y un ácido nucleico diana y engloba incompatibilidades menores que pueden ser ajustadas reduciendo la rigurosidad de los medios de hibridación para lograr la detección deseada de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

20 "Condiciones de hibridación rigurosas" y "condiciones de hibridación-lavado rigurosas", en el contexto de los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos tales como hibridaciones Southern y Northern, son dependientes de secuencia, y son diferentes bajo diferentes parámetros medioambientales. Secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid
25 Probes Parte I Capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, New York. Generalmente, las condiciones de hibridación y de lavado de alta rigurosidad están seleccionadas para ser aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Normalmente, bajo condiciones de alta rigurosidad una sonda se hibridará con su subsecuencia diana, pero no con otras secuencias.

30 La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Se seleccionan condiciones de rigurosidad muy alta para ser iguales a la T_m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación de alta rigurosidad para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios sobre un filtro en una transferencia Southern o Northern es 50 % de formamida con 1 mg de heparina a 42 °C, llevándose a cabo la hibridación durante
35 la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado de rigurosidad muy alta es NaCl 0,15 M a 72 °C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado de alta rigurosidad es un lavado 0,2x SSC a 65 °C durante 15 minutos (véase, Sambrook, abajo, para una descripción de tampón SSC). Frecuentemente, un lavado de alta rigurosidad va precedido de un lavado de baja rigurosidad para eliminar la señal de fondo de la sonda. Un lavado de rigurosidad media de ejemplo para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 1x SSC a
40 45 °C durante 15 minutos. Un lavado de baja rigurosidad de ejemplo para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 4-6x SSC a 40 °C durante 15 minutos. Para sondas cortas (por ejemplo, aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), condiciones de alta rigurosidad normalmente implican concentraciones de sales de ión Na inferiores a aproximadamente 1,0 M, normalmente concentración de ión Na aproximadamente 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH
45 7,0 a 8,3, y la temperatura normalmente es al menos aproximadamente 30 °C. También pueden lograrse condiciones de alta rigurosidad con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. En general, una relación de señal con respecto a ruido de 2x (o más alta) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica detección de una hibridación específica. Ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí bajo condiciones de alta rigurosidad son todavía sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Esto se produce, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la
50 máxima degeneración de codones permitida por el código genético.

Condiciones de baja rigurosidad incluyen hibridación con una disolución de tampón de 30 al 35 % de formamida, NaCl 1 M, 1 % de SDS (dodecilsulfato de sodio) a 37 °C, y un lavado en 1X a 2X SSC (20X SSC = NaCl 3,0 M / citrato de trisodio 0,3 M) a 50 a 55 °C. Condiciones de rigurosidad reducida a modo de ejemplo incluyen hibridación en 40 al 45 % de formamida, NaCl 1,0 M, 1 % de SDS a 37 °C, y un lavado en 0,5X a 1X SSC a 55 a 60 °C.
55 Condiciones de alta rigurosidad a modo de ejemplo incluyen hibridación en 0 % de formamida, NaCl 1 M, 1 % de SDS a 37 °C, y un lavado en 0,1 X SSC a 60 a 65 °C.

Lo siguiente son ejemplos de conjuntos de condiciones de hibridación/lavado que pueden usarse para clonar secuencias de nucleótidos homólogas que son sustancialmente idénticas a secuencias de nucleótidos de referencia de la presente invención: una secuencia de nucleótidos de referencia preferentemente se hibrida con la secuencia de nucleótidos de referencia en 7 % de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en 2X SSC, 0,1 % de SDS a 50 °C, más deseablemente en 7 % de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M,
60

EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en 1X SSC, 0,1 % de SDS a 50 °C, más deseablemente todavía en 7 % de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en 0,5X SSC, 0,1 % de SDS a 50 °C, preferentemente en 7 % de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en 0,1X SSC, 0,1 % de SDS a 50 °C, más preferentemente en 7 % de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en 0,1X SSC, 0,1 % de SDS a 65 °C.

La especificidad normalmente es la función de lavados post-hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la disolución de lavado final. Para híbridos de ADN-ADN, la T_m puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl, Anal. Biochem., 138: 267-284 (1984): $T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ de GC}) - 0,61 (\% \text{ de forma}) - 500/L$; en la que M es la molaridad de cationes monovalentes, % de GC es el porcentaje de nucleótidos guanosina y citosina en el ADN, % de forma es el porcentaje de formamida en la disolución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de una secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda perfectamente coincidente. T se reduce aproximadamente 1 °C por cada 1 % de desapareamiento; así, T_m , las condiciones de hibridación y/o de lavado pueden ajustarse para hibridarse con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con > 90 % de identidad, la T_m puede disminuirse 10 °C. Generalmente, se seleccionan condiciones de alta rigurosidad para ser aproximadamente 19 °C inferiores al punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, condiciones de muy alta rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado 1, 2, 3 o 4 °C más bajo que el punto de fusión térmico (T_m); condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado 6, 7, 8, 9 o 10 °C más bajo que el punto de fusión térmico (T_m); condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11,12,13,14, 15 o 20 °C más bajo que el punto de fusión térmico (T_m). Usando la ecuación, composiciones de hibridación y lavado, y T deseada, aquellos expertos habituales entenderán que las variaciones en la rigurosidad de hibridación y/o disoluciones de lavado están inherentemente descritas. Si el grado deseado de incompatibilidad produce una T inferior a 45 °C (disolución acuosa) o 32 °C (disolución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC de manera que pueda usarse una temperatura más alta. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993), Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte 1, Capítulo 2 (Elsevier, New York); y Ausubel et al., eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley - Interscience, New York). Véase Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York).

Una indicación adicional de que dos secuencias de ácidos nucleicos o proteínas son sustancialmente idénticas es que la proteína codificada por el primer ácido nucleico reacciona de forma inmunológicamente cruzada con, o se une específicamente a, la proteína codificada por el segundo ácido nucleico. Así, una proteína normalmente es sustancialmente idéntica a una segunda proteína, por ejemplo, donde las dos proteínas se diferencian solo por sustituciones conservativas.

"Promotor específico de tejido" se refiere a promotores regulados que no se expresan en todas las células vegetales, sino solo en uno o más tipos de células en órganos específicos (tales como hojas, raíces o semillas), tejidos específicos (tales como embrión o cotiledón), o tipos de células específicas (tales como parénquima de la hoja o células de almacenamiento de semillas). Éstos también incluyen promotores que son temporalmente regulados, tales como en embriogénesis temprana o tardía, durante la maduración del fruto en semillas en desarrollo, en hoja completamente diferenciada o en la aparición de senescencia.

"Gen transactivador" se refiere a un gen que codifica una proteína transactivadora. Puede codificar un factor de transcripción. Puede ser un gen natural, por ejemplo, un activador transcripcional de planta, o un gen quimérico, por ejemplo, cuando las secuencias reguladoras de planta están operativamente unidas al marco de lectura abierto de un factor de transcripción de otro organismo. Los "genes transactivadores" pueden estar cromosómicamente integrados o expresarse transitoriamente. "Activación en trans" se refiere a la activación del gen por la expresión de otro gen (regulador) en trans.

Un "casete transcripcional" comprenderá en la dirección 5'-3' de la transcripción una región de iniciación transcripcional y traduccional, una secuencia de ADN de interés y una región de terminación transcripcional y traduccional funcional en plantas. La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación de la transcripción, puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés, o puede derivarse de otra fuente.

El "sitio de iniciación de la transcripción" es la posición que rodea al primer nucleótido que es parte de la secuencia transcrita, que también se define como la posición +1. Con respecto a este sitio, se numeran todas las otras secuencias del gen y sus regiones de control. Secuencias en la dirección 3' (es decir, secuencias codificantes de proteína adicionales en la dirección 3') se denominan positivas, mientras que las secuencias en la dirección 5' (la mayoría de las regiones de control en la dirección 5') se denominan negativas.

El término "transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en el genoma de una célula huésped, produciendo herencia genéticamente estable. "Transitoriamente transformado" se refiere a células en las que se han introducido transgenes y ADN extraño (por ejemplo, por métodos tales como transformación mediada por *Agrobacterium* o bombardeo biolístico), pero no se seleccionan para mantenimiento estable.

"Transformación transitoria", en el contexto de un polinucleótido, pretende significar que un polinucleótido se introduce en la planta y no se integra en el genoma de la planta.

"Establemente transformada" se refiere a células que se han seleccionado y regenerado en un medio de selección tras la transformación.

5 "Transformado / transgénico / recombinante" se refieren a un organismo huésped tal como una bacteria o una planta en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. La molécula de ácido nucleico puede integrarse establemente en el genoma del huésped o la molécula de ácido nucleico también puede estar presente como una molécula extracromosómica. Una molécula extracromosómica tal puede ser auto-replicante. Se entiende que células transformadas, tejidos o plantas engloban no solo el producto final de un proceso de transformación, sino también la progenie transgénica del mismo. Un huésped "no transformado", "no transgénico" o "no recombinante" se refiere a un organismo no mutante, por ejemplo, una bacteria o planta, que no contiene la molécula de ácido nucleico heteróloga.

10 "Expresión transitoria" se refiere a la expresión en células en las que se introduce un virus o un transgén por infección viral o por métodos tales como transformación mediada por *Agrobacterium*, electroporación o bombardeo biolístico, pero no se seleccionan para su mantenimiento estable.

15 Como se usa en el presente documento, "componente genético" o "componentes genéticos" se refiere a cualquier secuencia de ácidos nucleicos o elemento genético que también pueda ser un componente o parte de una construcción de expresión. Ejemplos de componentes genéticos incluyen, pero no se limitan a, regiones de promotor, conductores no traducidos 5', intrones, genes, regiones no traducidas 3', potenciadores traduccionales o transcripcionales y otras secuencias reguladoras o secuencias que afectan la transcripción o traducción de una o más secuencias de ácidos nucleicos. Un componente genético puede ser secuencias de nucleótidos localizadas en la dirección 5' (secuencias no codificantes 5'), dentro de, o en la dirección 3' (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad de ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Incluyen secuencias naturales y sintéticas, además de secuencias, que puede ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales.

20 El término "secuencia de potenciador traduccional" se refiere a esa porción de secuencia de ADN de un gen entre el la secuencia de promotor y codificante que se transcribe en ARN y está presente en el ARNm completamente procesado aguas arriba (5') del codón de iniciación de la traducción. La secuencia de potenciador traduccional puede afectar el procesamiento del transcrito primario a ARNm, estabilidad de ARNm o eficiencia de traducción.

30 "Vector" se define para incluir, entre otros, cualquier plásmido, cósmido, fago o vector binario de *Agrobacterium* en forma lineal o circular bi- o monocatenaria que puede o puede no ser auto-transmisible o movilizable, y que puede transformar huésped procarionta o eucariota tanto por integración en el genoma celular como existir extracromosómicamente (por ejemplo, plásmido de replicación autónoma con un origen de replicación). Específicamente se incluyen vectores lanzadera por los que se indica un vehículo de ADN capaz, naturalmente o por diseño, de replicación en dos organismos huésped diferentes, que pueden seleccionarse de actinomicetos y especies, bacterias y eucariotas relacionados (por ejemplo, células de planta superior, mamífero, levadura o fúngicas).

35 "Marcador visible" se refiere a un gen cuya expresión no confiere una ventaja a una célula transformada, pero puede hacerse detectable o visible. Ejemplos de marcadores visibles incluyen, pero no se limitan a, β -glucuronidasa (GUS), luciferasa (LUC) y proteína verde fluorescente (GFP).

40 "No mutante" se refiere al gen normal, virus u organismo encontrado en la naturaleza sin ninguna mutación conocida.

45 El término "planta" se refiere a cualquier planta, particularmente a plantas agrónomicamente útiles (por ejemplo, plantas de semilla), y "célula de planta" es una unidad estructural y fisiológica de la planta, que comprende una pared celular, pero puede también referirse a un protoplasto. La célula de planta puede estar en forma de una célula individual aislada o una célula cultivada, o como parte de unidades organizadas superiores tales como, por ejemplo, un tejido de planta, o un órgano de planta diferenciado en una estructura que está presente en cualquier estadio de desarrollo de una planta. Los promotores y composiciones descritos en el presente documento pueden utilizarse en cualquier planta. Ejemplos de plantas que pueden utilizarse en realizaciones contenidas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, maíz (grano), trigo, arroz, cebada, soja, algodón, sorgo, judías en general, colza/canola, alfalfa, lino, girasol, alazor, mijo, centeno, caña de azúcar, remolacha azucarera, cacao, té, remolacha azucarera tropical, *Brassica* spp., algodón, café, patata dulce, lino, cacahuete, trébol; verduras tales como lechuga, tomate, cucurbitáceas, yuca, patata, zanahoria, rábano, guisante, lenteja, repollo, coliflor, brócoli, coles de Bruselas, pimientos y piña; frutas de árbol tales como cítricos, manzanas, peras, melocotones, albaricoques, nueces, aguacate, banana y coco; y flores tales como orquídeas, claveles y rosas. Otras plantas útiles en la práctica de la invención incluyen pastos perennes, tales como pasto varilla, pasto de pradera, pasto indio, pasto Big bluestem, miscanto y similares. Se reconoce que pueden usarse mezclas de plantas.

Como se usa en el presente documento, "material de planta", "parte de planta" o "tejido de planta" significa células vegetales, protoplastos de planta, cultivos de tejido de células de planta de los que pueden regenerarse plantas, callos de planta, masas de planta y células vegetales que están intactos en plantas o partes de plantas tales como embriones, polen, óvulos, semillas, hojas, flores, ramas, fruto, granos, espigas, mazorcas, cascarillas, tallos, raíces, puntas de raíz, anteras, tubérculos, rizomas y similares.

El término "tejido de hoja de planta joven" o "material de hoja de planta joven" se refiere a tejido de hoja que puede ser agro-infiltrado con una cepa de *Agrobacterium* que comprende un vector binario que comprende un casete de expresión usando un dispositivo de agro-infiltración en el que dicho casete de expresión comprende al menos un gen y el gen se transcribe transitoriamente en dicho tejido de hoja. Los términos "tejido de hoja de planta joven" y "material de hoja de planta joven" pretenden usarse para referirse indistintamente a tejido de hoja de planta que tiene como máximo 25 días de edad, suponiendo que la planta se cultiva en condiciones de invernadero o cámara de crecimiento convencionales. Se entiende que la planta podría cultivarse en condiciones inferiores a las óptimas y el tejido de planta joven que puede usarse en los métodos como se describen en el presente documento de plantas de crecimiento inferior al óptimo podría superar el máximo de 25 días. Los términos "tejido de hoja de planta joven" o "material de hoja de planta joven" pueden también referirse a la primera, segunda, tercera, cuarta o quinta hoja de una planta. Por ejemplo, la primera, segunda o tercera hoja de una planta de maíz madura se consideraría "tejido de hoja de planta joven" en la práctica de las realizaciones descritas en el presente documento. Además, por ejemplo, hojas de maíz del estadio de desarrollo V1-V6 se considerarían "tejido de planta joven" en la práctica de las realizaciones descritas en el presente documento, además de equivalentes de desarrollo de otras plantas monocotiledóneas.

Como se usa en el presente documento, "abaxial" se refiere a la parte inferior de una hoja de planta. El término "abaxial" pretende incluir cualquier porción de la parte inferior de una hoja de planta.

Como se usa en el presente documento, un "dispositivo de agro-infiltración" se refiere a cualquier dispositivo que pueda usarse para infiltrar una disolución de *Agrobacterium* en la parte inferior de una hoja. El término "dispositivo de agro-infiltración" pretende englobar jeringas sin aguja como se describen en los métodos en el presente documento. El término "dispositivo de agro-infiltración" también puede referirse a cualquier dispositivo que pueda usarse para infiltrar una disolución de *Agrobacterium* en la parte inferior de una hoja aplicando presión a dicha disolución y dicha disolución entra en el espacio celular intersticial de la hoja.

Preferentemente, una secuencia de nucleótidos reguladora de la transcripción de la invención comprende al menos una secuencia de promotor localizada en la dirección 5' del inicio de la transcripción del gen respectivo y es capaz de inducir la transcripción de secuencias en la dirección 3'. La secuencia de nucleótidos reguladora de la transcripción puede comprender la secuencia de promotor de dichos genes, pero puede comprender además otros elementos tales como la secuencia no traducida 5', secuencias de potenciador, intrón, exón, y/o incluso comprender intrón y exones del gen genómico asociado.

Los promotores pueden comprender varias regiones que desempeñan una función en la función del promotor. Algunas de estas regiones son modulares, en otras palabras, pueden usarse en el aislamiento para conferir actividad de promotor o pueden ensamblarse con otros elementos para construir nuevos promotores. La primera de estas regiones de promotor se encuentra inmediatamente en la dirección 5' de la secuencia codificante y forma la "región de promotor central" que contiene secuencias consenso, normalmente 20-70 pares de bases inmediatamente en la dirección 5' de la secuencia codificante. La región de promotor central normalmente contiene una caja TATA y frecuentemente un elemento iniciador, además del sitio de iniciación. La longitud precisa de la región de promotor central no es fija, pero es normalmente bien reconocible. Una región tal normalmente está presente, con alguna variación, en la mayoría de los promotores. La región de promotor central se denomina frecuentemente una región de promotor mínima debido a que es funcional sola para promover un nivel basal de transcripción.

La presencia de la región de promotor central define que una secuencia es un promotor: si la región está ausente, el promotor es no funcional. La región central actúa atrayendo la maquinaria de transcripción general al promotor para la iniciación de la transcripción. Sin embargo, la región de promotor central normalmente no es suficiente para proporcionar actividad de promotor a un nivel deseado. Una serie de secuencias reguladoras, frecuentemente en la dirección 5' del núcleo, constituye el resto del promotor. Las secuencias reguladoras pueden determinar el nivel de expresión, el patrón espacial y temporal de la expresión y, para un subconjunto de promotores, la expresión bajo condiciones inductivas (regulación por factores externos tales como luz, temperatura, productos químicos y hormonas). Secuencias reguladoras pueden ser regiones cortas de secuencia de ADN de 6-100 pares de bases que definen los sitios de unión para los factores que actúan en trans, tales como factores de transcripción. Las secuencias reguladoras también pueden ser potenciadores, regiones más largas de secuencia de ADN que pueden actuar desde una distancia de la región de promotor central, algunas veces durante varios kilobases desde la región central. La actividad de secuencia reguladora puede influirse por factores que actúan en trans que incluyen, pero no se limitan a, maquinaria de transcripción general, factores de transcripción y factores de ensamblaje de la cromatina.

En el presente documento, el término "datos cuantitativos" se refiere a cualquier dato que pueda expresarse como una cantidad. Por ejemplo, una cantidad de enzima expresada en planta por gramo de tejido de planta. Otro ejemplo puede ser el número de células transfectadas transitoriamente con un gen indicador tal como GUS, GFP o algún otro

gen indicador adecuado. Otro ejemplo puede ser el número de copias de genes transcritas como se determina mediante PCR. Los datos cuantitativos no tienen que ser exactos; en el presente documento estos datos se denominarán "semi-cuantitativos". Por ejemplo, puede determinarse que una planta produce más de una proteína relevante que otra planta mirando visualmente, por ejemplo, una transferencia Western. O, puede, por ejemplo, determinarse rápidamente la cantidad de almidón producida expresando transitoriamente un gen implicado en la vía de síntesis de almidón, simplemente por tinción del tejido transitoriamente transfectedo con yodo. El tejido con la tinción más oscura contendría semi-cuantitativamente más almidón que el tejido transfectedo teñido más claro o de control.

En el presente documento, el término "datos cualitativos" se refiere a cualquier dato que pueda expresarse con respecto a la calidad. Por ejemplo, la visualización en una transferencia Western de que una proteína de tejido de planta transitoriamente transfectedo está siendo escindida en comparación con proteína de longitud completa se consideraría datos cualitativos. Los datos cualitativos también podrían ser la presencia o no presencia de un fenotipo particular. Por ejemplo, una xilansa transitoriamente expresada en tejido de hoja de planta puede producir una clorosis del tejido de hoja.

En el presente documento, los términos "modelo predictivo", "modelo predictivo transitorio", "modelo predictivo de expresión génica" se refieren a cualquier correlación entre gen transitoriamente expresado, casetes de expresión y/o componentes génicos y el rendimiento respectivo en líneas de plantas transgénicas estables. Por ejemplo, un casete de expresión A en el que una amilasa está operativamente unida a una secuencia de direccionamiento de cloroplasto y un casete de expresión B en el que una amilasa está operativamente unida a una secuencia de direccionamiento de retículo endoplásmico (ER) y todos los otros componentes genéticos son iguales, los efectos del direccionamiento génico pueden ser rápidamente comparados transitoriamente en tejido de hoja con respecto a los niveles de expresión de enzima y formularse un "modelo predictivo" para el que el direccionamiento rendiría mejor en líneas transgénicas estables. Esto puede lograrse, por ejemplo: a) suministrando el casete de expresión A y el casete de expresión B en plantas separadas mediante agro-infiltración de tejido de hoja de 7 días de edad; b) expresando transitoriamente los casetes de expresión A y B en dicho tejido de hoja; c) muestrear tejido de hoja a las 24, 48 o 72 horas; d) realizar un ensayo de enzima amilasa tal como un ensayo Ceralpha (MEGAZYME, Irlanda); e) recoger datos cuantitativos; y f) formular un modelo predictivo basándose en la expresión de proteínas transitoria por gramo de tejido de hoja. En algunas realizaciones, el rendimiento transitorio puede no coincidir exactamente con el rendimiento de transgénicos estables que expresan el mismo gen, casete de expresión o componente genético, sin embargo puede observarse una tendencia. Por ejemplo, el casete de expresión A en el ejemplo anterior puede producir 1 µg/g de tejido de hoja de amilasa y el casete de expresión B en el ejemplo anterior puede producir 10 µg/g y si uno era para transformar establemente el casete de expresión A y B en líneas de maíz transgénicas estables, los niveles de expresión pueden ser 5 µg/g y 50 µg/g, manteniendo respetuosamente la tendencia que se observó en los datos transitorios. En otra realización, los datos transitorios en tejido de hoja pueden ser predictivos de cómo un gen, casete de expresión o componente genético rinde en otras partes de planta, por ejemplo, semilla, raíz o tejido reproductivo. Un modelo predictivo en este escenario indicaría a un experto en la materia que el direccionamiento de una amilasa al ER sería una estrategia mejor que a la vacuola si se quieren producir grandes cantidades de amilasa *in planta*. Modelos predictivos que usan los métodos descritos en el presente documento no se limitan a los niveles de expresión de proteína, pero también pueden usarse para cualquier dato cuantitativo o cualitativo derivado de genes transitoriamente expresados, casetes de expresión o componente genéticos.

"Transfección transitoria" o "transitoriamente transfectedo" en el presente documento significa que la introducción de dicha secuencia de ADN heteróloga se hace sin selección de células transfectedas para la incorporación estable de dicha secuencia de ADN heteróloga en un cromosoma de planta. Un casete de expresión puede introducirse en una parte de planta usando una cepa de *Agrobacterium* capaz de introducir ADN extraño en células vegetales. La expresión transitoria de un gen y/o casete de expresión puede observarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más días. Preferentemente, la expresión transitoria puede observarse durante 24 horas. Más preferible, la expresión transitoria puede observarse durante 48 horas. Lo más preferentemente, la expresión transitoria puede observarse durante 72 horas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan métodos para expresar transitoriamente genes, casetes de expresión o componentes génicos. El método comprende agro-infiltración de un vector binario que comprende al menos un casete de expresión en una parte de planta (por ejemplo, hoja de planta), en el que el casete de expresión contiene al menos un promotor operativamente unido a un gen heterólogo. Las plantas resultantes de la presente invención expresan transitoriamente genes, casetes de expresión o componentes génicos *in planta* a niveles de expresión suficientes en servir como modelo predictivo para cómo un gen respectivo, casete de expresión o componente génico rendirá operativamente en líneas de plantas transgénicas estables.

En el proceso de la invención, un gen, casete de expresión y/o componente genético se expresa transitoriamente en partes de planta o más preferentemente hojas de planta. La expresión génica, rendimiento de promotor, actividad génica, función y forma de la proteína son algunos ejemplos de lo que puede evaluarse en casetes de expresión transitorios y sirven de modelo predictivo de cómo una cierta configuración de casete de expresión, gen y/o componente genético pueden rendir en líneas de plantas establemente transgénicas. Un método para expresar

transitoriamente genes, casetes de expresión, o componentes génicos *in planta*, puede ser deseable a través de múltiples industrias, por ejemplo, pero no se limitan a, agricultura comercial, etanol, pienso para animales, plásticos, productos químicos, aplicaciones médicas y otras industriales.

5 Los métodos de la invención encuentran uso en la integración de las actuales prácticas para el cultivo de plantas de cultivo con el fin de obtener una línea de planta transgénica estable comercialmente deseada que expresa óptimamente un gen de interés. La capacidad para evaluar rápidamente el rendimiento génico, configuración del casete de expresión y efectos de componentes genéticos sobre el rendimiento de expresión está englobada en la presente invención. Los métodos de la invención pueden reducir el tiempo, recursos y el espacio necesario para evaluar genes, casetes de expresión o componentes génicos en comparación con los medios convencionales de generación de líneas de plantas transgénicas estables y dar las mismas evaluaciones en la parte o partes de planta transgénica estable correspondientes. En una realización, la invención puede reducir el tiempo de evaluación en la selección de expresión génica óptima en plantas transgénicas estables a los 6-12 meses, además de permitir rápidamente la selección de la mejor configuración de casete de expresión para la expresión génica. En otra realización, la invención puede reducir el tiempo de evaluación en la selección de expresión génica óptima en plantas transgénicas estables a los 12-24 meses o más. En algunas realizaciones, la invención puede reducir el tiempo de evaluación en la selección de expresión génica óptima en plantas transgénicas estables a los 1-12 meses o más.

20 En una realización, los métodos descritos en el presente documento pueden emplearse en cualquier planta. Más preferentemente, los métodos descritos en el presente documento pueden emplearse en plantas de cultivo. Otro aspecto de los métodos descritos en el presente documento es que un casete de expresión y sus componentes génicos relevantes pueden expresarse transitoriamente en cualquier parte de planta como se describe. Más preferentemente, un casete de expresión puede expresarse transitoriamente en material de planta fotosintético. Lo más preferible es que los actuales métodos puedan emplearse para expresar transitoriamente un casete de expresión, gen y/o componente genético en tejido de hoja de planta. Otro aspecto más de la invención es que la agro-infiltración de casetes de expresión descrita en el presente documento transfecteda transitoriamente en tejido de hoja de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más días de edad producirá una expresión transitoria de dicho casete de expresión de un modo donde pueden recogerse datos cualitativos y/o cuantitativos mediante procedimientos muy conocidos en la técnica, que pueden ser además predictivos de cómo dicho casete de expresión rendirá en líneas transgénicas estables transformadas con dicho casete de expresión o componentes genéticos correspondientes. En una realización preferida, tejido de hoja de maíz de 7 días se agro-infiltra con el casete de expresión y los componentes genéticos como se describe en el presente documento.

35 En una realización preferida de la invención, la parte de planta se agro-infiltra en tejido de hoja en el que una disolución de Agrobacterias transformada con el casete de expresión de interés se infiltra en el espacio intersticial del tejido de planta (por ejemplo, tejido de hoja). También se entiende que la invención puede realizarse usando biolística o cualquier otra tecnología de transformación conocida por aquellos expertos en la técnica relevante o descrita en el presente documento.

40 En una realización de la invención, el tejido de hoja de planta joven es de maíz y el tejido de hoja de maíz tiene una edad de hoja máxima de aproximadamente V1 a aproximadamente V6 o aproximadamente 2 meses de edad en la que la planta de maíz se cultivó en condiciones de invernadero y/o de cámara de crecimiento convencionales. En otra realización, el tejido de hoja joven de maíz es la hoja 1 de una planta de maíz que tiene aproximadamente un máximo de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 días de edad. Se entiende que las plantas de maíz cultivadas en condiciones inferiores a las óptimas deben comprender tejido de hoja joven que puede utilizarse en realizaciones como se describen en el presente documento en las que la edad de la planta de maíz supera 30, 40, 50, 60 o 70 días de edad.

45 Genotipos de maíz preferidos que pueden usarse con la invención puede ser, pero no se limitan a, por ejemplo, AX5707 y FF6096. Genotipos de arroz preferidos que pueden usarse con la invención puede ser, pero no se limitan a, arroz Nipponbare 198. Genotipos de sorgo preferidos que pueden usarse con la invención pueden ser, pero no se limitan a, brandes, della y dale. Genotipos de trigo preferidos que pueden usarse con la invención en algunas realizaciones pueden ser, pero no se limitan a, AC Nanda, TLAXCALA F2000, CALINGIRI, OMSKAYA 33, Catalido. 50 Genotipos de avena preferidos que pueden usarse con la invención pueden ser, pero no se limitan a, avena integral SSC-31-913200.

55 En una realización de la invención, el tejido de hoja de planta joven es de caña de azúcar y el tejido de hoja de caña de azúcar es de una edad de hoja máxima de aproximadamente 7 a 12 días de edad en la que la planta de caña de azúcar se cultivó en condiciones de invernadero y/o de cámara de crecimiento convencionales. En otra realización, el tejido de hoja joven de caña de azúcar es la hoja 1 de una planta de caña de azúcar que tiene aproximadamente un máximo de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 días de edad. Se entiende que las plantas de caña de azúcar cultivadas en condiciones inferiores a las óptimas podrían comprender tejido de hoja joven que puede utilizarse en realizaciones como se describen en el presente documento en las que la edad de la planta de caña de azúcar supera los 30, 40, 50, 60 o 70 días de edad.

- En otra realización de la invención, el tejido de hoja de planta joven es de sorgo y el tejido de hoja de sorgo es de una edad de hoja máxima de aproximadamente 20 días de edad en la que planta de sorgo se cultivó en condiciones de invernadero y/o de cámara de crecimiento convencionales. En otra realización, el tejido de hoja joven de sorgo es la hoja 1 de una planta de caña de azúcar que tiene aproximadamente un máximo de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 días de edad. Se entiende que las plantas de sorgo cultivadas en condiciones inferiores a las óptimas podrían comprender tejido de hoja joven que puede utilizarse en realizaciones como se describen en el presente documento en las que la edad de la planta de sorgo supera los 30, 40, 50, 60 o 70 días de edad.
- En otra realización más de la invención, el tejido de hoja de planta joven es de arroz y el tejido de hoja de arroz es de una edad de hoja máxima de aproximadamente 40 días de edad en la que la planta de arroz se cultivó en condiciones de invernadero y/o de cámara de crecimiento convencionales. En otra realización, el tejido de hoja joven de arroz es la hoja 1 de una planta de arroz que tiene aproximadamente un máximo de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 días de edad. Se entiende que las plantas de arroz crecidas en condiciones inferiores a las óptimas podrían comprender tejido de hoja joven que puede utilizarse en realizaciones como se describen en el presente documento en las que la edad de la planta de arroz supera los 30, 40, 50, 60 o 70 días de edad.
- En otra realización más de la invención, el tejido de hoja de planta joven es de un pasto y el tejido de hoja de pasto es de una edad de hoja máxima de aproximadamente 30 días de edad en la que el pasto se cultivó en condiciones de invernadero y/o de cámara de crecimiento convencionales. En otra realización, el tejido de hoja joven de pasto es la hoja 1 de un pasto que tiene aproximadamente un máximo de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 días de edad.
- En una realización de la invención pueden usarse potenciadores traduccionales o transcripcionales para aumentar la expresión de proteínas transitoria. En una realización preferida, puede usarse una región de potenciador del virus del mosaico de la escrofularia (eFMV). En otra realización preferida, el potenciador del virus del mosaico de la escrofularia (eFMV) se usa en combinación con un potenciador del virus del mosaico de la coliflor 35s para el aumento de la expresión de un gen en plantas transitorias y/o establemente transformadas.
- Un aspecto de la invención es que no hay limitación de tamaño en el gen que está siendo transitoriamente expresado, a diferencia de los métodos de transfección transitoria viral. Los sistemas de transfección transitoria viral están limitados en el tamaño del gen que puede transfectarse en una célula de planta. En una realización de la invención, el gen heterólogo que se introduce mediante agro-infiltración puede ser superior a 0,1, 0,5, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 o 10,0 kilobases.
- Los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles en evaluar las enzimas de procesamiento expresadas *in planta*. Por ejemplo, la enzima de procesamiento relevante puede evaluarse cuantitativamente o cualitativamente expresando transitoriamente la enzima de procesamiento en tejido de planta como se describe en los métodos en el presente documento. "Enzimas de procesamiento" adecuadas incluyen, pero no se limitan a, enzimas degradadoras o isomerizantes de almidón que incluyen, por ejemplo, α -amilasa, endo o exo-1,4, o 1,6- α -D, glucoamilasa, glucosa isomerasa, β -amilasas, α -glucosidasas, y otras exo-amilasas; y enzimas desramificantes de almidón, tales como isoamilasa, pululanasa, neo-pululanasa, iso-pululanasa, amilopululanasa y similares, glicosiltransferasas tales como ciclodextrina glicosiltransferasa y similares, celulasas tales como exo-1,4- β -celobiohidrolasa, exo-1,3-O-D-glucanasa, hemicelulasa, β -glucosidasa y similares; endoglucanasas tales como endo-1,3- β -glucanasa y endo-1,4- β -glucanasa y similares; L-arabinasas, tales como endo-1,5- α -L-arabinasa, α -arabinosidasas y similares; galactanasas tales como endo-1,4- β -D-galactanasa, endo-1,3- β -D-galactanasa, 1-galactosidasa, α -galactosidasa y similares; mananasas, tales como endo-1,4- β -D-mananasa, β -manosidasa, α -manosidasa y similares; xilanasas, tales como endo-1,4-1-xilanasa, β -D-xilosidasa, 1,3- β -D-xilanasa, y similares; y pectinasas; y enzimas de procesamiento no de almidón, que incluyen proteasa, glucanasa, xilanasa, tiorredoxina/tiorredoxina reductasa, esterasa, fitasa y lipasa. En un aspecto de la invención, puede evaluarse una enzima de procesamiento y formularse un modelo predictivo transitorio basándose en las mediciones de la enzima de procesamiento y subproducto reactivo del sustrato respectivo. Por ejemplo, un experto en la materia puede usar los métodos descritos en el presente documento para expresar transitoriamente una amilasa en planta, poner la amilasa en contacto con un sustrato y medir la cantidad de maltodextrinas liberadas usando HPLC u otros métodos conocidos por aquellos expertos en la materia. El sustrato puede estar presente *in planta* o la enzima transitoriamente expresada puede aislarse y ponerse en contacto *in situ* con su sustrato relevante. También puede evaluarse la combinación de enzimas sobre un sustrato (por ejemplo, almidón o celulosa) usando los métodos descritos en el presente documento.

Casetes de expresión en planta

- Las composiciones de la invención pueden contener secuencias de ácidos nucleicos para la transformación y expresión transitoria o estable en una planta de interés. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden estar presentes en construcciones de ADN o casetes de expresión. Un casete de expresión bajo la definición previa puede ser una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula huésped apropiada, que comprende un promotor operativamente unido a la secuencia de nucleótidos de interés (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima de procesamiento) que está operativamente unida a señales de terminación. Los casetes de expresión también comprenden normalmente secuencias requeridas para la

apropiada traducción de la secuencia de nucleótidos. La región codificante normalmente codifica una proteína de interés, pero puede también codificar un ARN funcional de interés, por ejemplo ARN antisentido o un ARN no traducido, en la dirección sentido o antisentido. El casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico, que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser uno que existe de forma natural, pero ha sido obtenido en una forma recombinante útil para expresión heteróloga. Normalmente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al huésped, es decir, la secuencia de ADN particular del casete de expresión no se produce naturalmente en la célula huésped y debe haber sido introducida en la célula huésped o un antepasado de la célula huésped por un evento de transformación. La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión puede ser bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la transcripción solo cuando la célula huésped se expone a algún estímulo externo particular. Adicionalmente, el promotor también puede ser específico para un tejido u órgano particular o estadio de desarrollo.

La presente invención engloba la transformación de plantas con casetes de expresión capaces de expresar transitoriamente polinucleótidos. En realizaciones representativas, el casete de expresión incluirá en la dirección 5'-3' de la transcripción una región de iniciación transcripcional y traduccional (es decir, un promotor) y un polinucleótido de interés, y componentes genéticos (es decir, potenciadores traduccionales). El casete de expresión puede comprender opcionalmente una región de terminación transcripcional y traduccional (es decir, región de terminación) funcional en plantas. Los casetes de expresión de la invención también pueden comprender una secuencia conductora y/o una secuencia que permite la expresión inducible del polinucleótido de interés. Véase, Guo et al. (2003) *Plant J.* 34:383-92 y Chen et al. (2003) *Plant J.* 36:731-40 para ejemplos de secuencias que permiten la expresión inducible. Las secuencias reguladoras de la construcción de expresión están operativamente unidas al polinucleótido de interés.

Cualquier promotor capaz de conducir la expresión en la planta de interés puede usarse en la práctica de la invención. En una realización, puede evaluarse un promotor preferido no de hoja y/o específico no de hoja cuantitativa y/o cualitativamente y formularse un modelo predictivo para predecir cómo un promotor rendirá en su tejido preferido y/o específico respectivo. Por ejemplo, puede evaluarse transitoriamente un promotor específico de semilla en tejido de hoja usando métodos descritos en el presente documento. Se ha informado de varios genes y/o promotores regulados específicos de tejido en plantas. Algunos genes específicos de tejidos informados incluyen los genes que codifican las proteínas de almacenamiento de semillas (tales como napina, cruciferina, beta-conglicina y faseolina), zeína o proteínas de cuerpos de aceite (tales como oleosina), o genes implicados en la biosíntesis de los ácidos grasos (incluyendo proteína transportadora de acilo, estearoil-ACP desaturasa y ácido graso desaturasa (fad 2-1)), y otros genes expresados durante el desarrollo embrionario (tales como Bce4, véase, por ejemplo, el documento EP 255378 y Kridl et al., *Seed Science Research*, 1:209 (1991)). Ejemplos de promotores específicos de tejido, que se han descrito, incluyen la lectina (Vodkin, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 138:87 (1983); Lindstrom et al., *Dev. Genet.*, 11:160 (1990)), alcohol deshidrogenasa 1 de maíz (Vogel et al., 1989; Dennis et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:3983 (1984)), complejo captador de luz de maíz (Simpson, 1986; Bansal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3654 (1992)), proteína de choque térmico de maíz (Odell et al., 1985; Rochester et al., 1986), carboxilasa de subunidad RuBP pequeña de guisante (Poulsen et al., 1986; Cashmore et al., 1983), manopina sintasa de plásmido Ti (Langridge et al., 1989), nopalina sintasa de plásmido Ti (Langridge et al., 1989), chalcona isomerasa de petunia (vanTunen et al., *EMBO J.*, 7:1257 (1988)), proteína 1 rica en glicina de judía (Keller et al., *Genes Dev.*, 3:1639 (1989)), CaMV 35s truncado (Odell et al., *Nature*, 313:810 (1985)), patatina de patata (Wenzler et al., *Plant Mol. Biol.*, 13:347 (1989)), célula de raíz (Yamamoto et al., *Nucleic Acids Res.*, 18:7449 (1990)), zeína de maíz (Reina et al., *Nucleic Acids Res.*, 18:6425 (1990); Kriz et al., *Mol. Gen. Genet.*, 207:90 (1987); Wandelt et al., *Nucleic Acids Res.*, 17:2354 (1989); Langridge et al., *Cell*, 34:1015 (1983); Reina et al., *Nucleic Acids Res.*, 18:7449 (1990)), globulina-1 (Belanger et al., *Genetics*, 129:863 (1991)), α -tubulina, cab (Sullivan et al., *Mol. Gen. Genet.*, 215:431 (1989)), PEPCasa (Hudspeth & Guala, 1989), promotores asociados al complejo del gen R (Chandler et al., *Plant Cell*, 1:1175 (1989)) y promotores de chalcona sintasa (Franken et al., *EMBO J.*, 10:2605 (1991)). Particularmente útil para la expresión específica de semilla es el promotor de vicilina de guisante (Czako et al., *Mol. Gen. Genet.*, 235:33 (1992)). (Véase también la patente de EE.UU. N.º 5.625.136). Otros promotores útiles para la expresión en hojas maduras son aquellos que se activan con el inicio de la senescencia, tales como el promotor de SAG de *Arabidopsis* (Gan et al., *Science*, 270:1986 (1995)). El promotor puede ser nativo o análogo o extraño o heterólogo a la planta huésped.

Modelos predictivos transitorios formulados por los métodos descritos en el presente documento pueden evaluar los promotores basados en varios factores, que incluyen, pero no se limitan a, eficiencia, capacidad de selección, inducibilidad, nivel de expresión deseado y preferencia de expresión en célula o tejido. Es una cuestión rutinaria que un experto en la materia module la expresión de una secuencia seleccionando y posicionando apropiadamente promotores y otras regiones reguladoras con respecto a esa secuencia. Los métodos descritos en el presente documento permiten la rápida evaluación de la selección y posicionamiento de promotores.

Algunos promotores adecuados inician la transcripción solo, o predominantemente, en ciertos tipos de células. Así, como se usa en el presente documento, un tipo de promotor preferencial de células o de tejido es uno que conduce la expresión preferencialmente en el tejido diana, pero puede también conducir a alguna expresión en otros tipos de células o tejidos también. Se entiende que algunos promotores que muestran direccionamiento preferencial de la expresión en tejidos diana pueden también presentar expresión "con fugas" en tejidos dirigidos no preferenciales. Un

ejemplo puede ser un promotor cuyo perfil de expresión muestra expresión preferencial en semilla de maíz, pero también presenta fuerte expresión en tejido de hoja maduro. Métodos de identificación y caracterización de regiones de promotor en ADN genómico de planta incluyen, por ejemplo, aquellas descritas en las siguientes referencias: Jordano, et al., *Plant Cell*, 1:855-866 (1989); Bustos, et al., *Plant Cell*, 1:839-854 (1989); Green, et al., *EMBO J.* 7, 4035-4044 (1988); Meier, et al., *Plant Cell*, 3, 309-316 (1991); y Zhang, et al., *Plant Physiology* 110: 1069-1079 (1996). Se han descrito varios promotores de planta con diversas características de expresión. Ejemplos de algunos promotores constitutivos que se han descrito incluyen la actina 1 de arroz (Wang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 12:3399 (1992); patente de EE.UU. N.º 5.641.876), CaMV.sup.35S (Odell et al., *Nature*, 313:810 (1985)), CaMV 19S (Lawton et al., 1987), nos (Ebert et al., 1987), Adh (Walker et al., 1987), sacarosa sintasa (Yang & Russell, 1990) y los promotores de ubiquitina.

Promotores activos en el tejido fotosintético con el fin de conducir la transcripción en tejidos verdes tales como hojas y tallos pueden ser de interés en la presente invención. Ejemplos de tales promotores incluyen los promotores de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RbcS) tales como el promotor de RbcS de alerce oriental (*Larix laricina*), el promotor cab6 de pino (Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35:773-778), el promotor del gen Cab-1 de trigo (Fejes et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:921-932), el promotor CAB-1 de espinaca (Lubberstedt et al. (1994) *Plant Physiol.* 104:997-1006), el promotor cab1R de arroz (Luan et al. (1992) *Plant Cell* 4:971-981), el promotor de piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK) de maíz (Matsuoka et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9586-9590), el promotor Lhcb1*2 de tabaco (Cerdan et al. (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:245-255), el promotor SUC2 simporter sacarosa-H+ de *Arabidopsis thaliana* (Truernit et al. (1995) *Plant* 196:564-570) y promotores de la proteína de membrana tilacoidal de espinaca (psaD, psaF, psaE, PC, FNR, atpC, atpD, cab, rbcS). Otros promotores que conducen la transcripción en tallos, hojas y tejido verde se describen en la publicación de patente de EE.UU. N.º 2007/0006346. Promotores activos en tejido fotosintético pueden ser transitoriamente evaluados y formularse modelos predictivos.

Puede desearse la evaluación de promotores inducibles. Los promotores inducibles conducen la transcripción en respuesta a estímulos externos tales como agentes químicos o estímulos medioambientales. Por ejemplo, los promotores inducibles pueden conferir la transcripción en respuesta a hormonas tales como ácido giberélico o etileno, o en respuesta a luz o sequía. Se ha informado de varios promotores inducibles. Muchos se describen en una revisión por Gatz, en *Current Opinion in Biotechnology*, 7:168 (1996) y Gatz, C., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:89 (1997). Ejemplos incluyen sistema represor de tetraciclina, sistema represor de Lac, sistemas inducibles por cobre, sistemas inducibles por salicilato (tales como el sistema PR1a), sistemas inducibles por glucocorticoides (Aoyama T. et al., *N-H Plant Journal*, 11:605 (1997)) e inducibles por ecdisona. Otros promotores inducibles incluyen promotores inducibles por ABA y turgor, el promotor del gen de la proteína de unión a auxina (Schwob et al., *Plant J.*, 4:423 (1993)), el promotor del gen de glicosil-transferasa de UDP-glucosa flavonoide (Ralston et al., *Genetics*, 119:185 (1988)), el promotor de inhibidores de MPI proteinasa (Cordero et al., *Plant J.*, 6:141 (1994)) y el promotor del gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Kohler et al., *Plant Mol. Biol.*, 29: 1293 (1995); Quigley et al., *J. Mol. Evol.*, 29:412 (1989); Martinez et al., *J. Mol. Biol.*, 208:551 (1989)). También están incluidos los sistemas inducibles por bencenosulfonamida (patente de EE.UU. N.º 5.364.780) e inducibles por alcohol (documentos WO 97/06269 y WO 97/06268) y promotores de glutatión S-transferasa. Otros estudios se han centrado en genes induciblemente regulados en respuesta a estrés medioambiental o estímulos tales como elevada salinidad, sequía, patógeno y daños (Graham et al., *J. Biol. Chem.*, 260:6555 (1985); Graham et al., *J. Biol. Chem.*, 260:6561 (1985), Smith et al., *Plant*, 168:94 (1986)). Se ha informado de la acumulación de proteína del inhibidor de la metalocarboxipeptidasa en hojas de plantas de patata dañadas (Graham et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 101:1164 (1981)). Se ha informado que otros genes de planta son inducidos por jasmonato de metilo, desencadenantes, choque térmico, estrés anaerobio o protectores de herbicidas. La expresión regulada de una proteína de replicación viral de acción en trans quimérica puede regularse adicionalmente por otras estrategias genéticas, tales como, por ejemplo, activación génica mediada por Cre (Odell et al. *Mol. Gen. Genet.*, 113:369 (1990)). Así, un fragmento de ADN que contiene la secuencia reguladora 3' unida por sitios lox entre el promotor y la secuencia codificante de proteína de replicación que bloquea la expresión de un gen de replicación quimérica del promotor puede eliminarse por escisión mediada por Cre y producir la expresión del gen de replicación que actúa en trans. En este caso, el gen Cre quimérico, el gen de replicación que actúa en trans quimérico, o ambos, pueden estar bajo el control de promotores específicos de tejido y de desarrollo o inducibles. Una estrategia genética alternativa es el uso de un gen supresor de ARNt. Por ejemplo, la expresión regulada de un gen supresor de ARNt puede controlar condicionalmente la expresión de una secuencia codificante de proteína de replicación que actúa en trans que contiene un codón de terminación apropiado (Ulmasov et al. *Plant Mol. Biol.*, 35:417 (1997)). Otra vez, tanto el gen supresor de ARNt quimérico, el gen de replicación de actuación en trans quimérico, o ambos, pueden estar bajo el control de promotores específicos de tejido y de desarrollo o inducibles. Preferentemente, en el caso de un organismo multicelular, el promotor también puede ser específico para un tejido particular, órgano o estadio de desarrollo. Ejemplos de tales promotores incluyen, pero no se limitan a, el promotor ADP-gpp de *Zea mays* y de γ -zeína de *Zea mays* y de globulina de *Zea mays*. Una realización de la invención puede ser una forma rápida para evaluar el rendimiento de promotor inducible sobre la expresión de un gen de interés en transgénicos de línea estable formulando modelos predictivos de datos cuantitativos y/o cualitativos derivados de la expresión transitoria usando los métodos descritos en el presente documento.

La expresión transitoria de un gen en una parte de planta puede desearse solo en un cierto periodo de tiempo durante el desarrollo de la planta. El momento preciso del desarrollo se correlaciona frecuentemente con expresión

génica específica de tejido. Por ejemplo, la expresión de proteínas de almacenamiento de zeína se inicia en el endospermo aproximadamente 15 días después de la polinización.

Está disponible una variedad de terminadores transcripcionales para su uso en casetes de expresión. Estos son responsables de la terminación de la transcripción más allá del transgén y la correcta poliadenilación de ARNm. La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación de la transcripción, puede ser nativa con la secuencia de ADN operativamente unida de interés, puede ser nativa con el huésped de planta, o puede derivarse de otra fuente (es decir, extraña o heteróloga al promotor, la secuencia de ADN de interés, la planta huésped, o cualquier combinación de los mismos). Terminadores transcripcionales apropiados son aquellos que son conocidos por funcionar en plantas e incluyen el terminador de CAMV 35S, el terminador tml, el terminador de nopalina sintasa y el terminador rbcS E9 de guisante. Estos pueden usarse en tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Además, puede usarse un terminador de transcripción nativo del gen. Una realización de la invención puede ser una forma rápida de evaluar los efectos de secuencias terminadoras sobre la expresión de un gen de interés en transgénicos de línea estables formulando modelos predictivos a partir de datos cuantitativos y/o cualitativos derivados de la expresión transitoria usando los métodos descritos en el presente documento.

Se ha encontrado que numerosas secuencias potencian la expresión génica desde dentro de la unidad transcripcional y estas secuencias pueden usarse conjuntamente con los genes de la presente invención para aumentar su expresión en plantas transgénicas.

Se ha mostrado que diversas secuencias de intrón potencian la expresión, particularmente en células monocotiledóneas. Por ejemplo, se ha encontrado que los intrones del gen *Adhl* de maíz potencian significativamente la expresión del gen no mutante bajo su promotor relacionado cuando se introducen en células de maíz. Se encontró que el intrón 1 era particularmente eficaz y potenció la expresión en construcciones de fusión con el gen cloranfenicol acetiltransferasa (Callis et al., *Genes Develop.* 1: 1183-1200 (1987)). En el mismo sistema experimental, el intrón del gen *brn1* de maíz tuvo un efecto similar en potenciar la expresión. Las secuencias de intrón se han incorporado rutinariamente en vectores de transformación de planta, normalmente dentro del conductor no traducido.

También se conocen varias secuencias conductoras no traducidas derivadas de virus para potenciar la expresión. Específicamente, se ha mostrado que secuencias conductoras del virus del mosaico del tabaco (TMV, la "secuencia W"), virus moteado clorótico del maíz (MCMV) y virus del mosaico de la alfalfa (AMV) son eficaces en potenciar la expresión (por ejemplo, Gallie et al. *Nucl. Acids Res.* 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski et al. *Plant Molec. Biol.* 15: 65-79 (1990)). Otras secuencias conductoras conocidas en la técnica incluyen, pero no se limitan a: conductores de picornavirus, por ejemplo, conductor de EMCV (región no codificante 5' de encefalomiocarditis) (Elroy-Stein, O., Fuerst, T. R., y Moss, B. *PNAS USA* 86:6126-6130 (1989)); conductores de potyvirus, por ejemplo, conductor de TEV (virus del grabado del tabaco) (Allison et al., 1986); conductor de MDMV (virus del mosaico del enanismo del maíz); conductor de proteína de unión de la cadena pesada de inmunoglobulina humana (BiP) (Macejak, D. G., y Samow, P., *Nature* 353: 90-94 (1991)); conductor no traducido de ARNm de proteína de la envuelta del virus del mosaico de la alfalfa (ARN 4 de AMV), (Jobling, S. A., y Gehrke, L., *Nature* 325:622-625 (1987)); conductor del virus del mosaico del tabaco (TMV), (Gallie, D. R. et al., *Molecular Biology of RNA*, páginas 237-256 (1989)); y conductor del virus moteado clorótico del maíz (MCMV) (Lommel, S. A. et al., *Virology* 81:382-385 (1991)). Véase, por tanto, Della-Cioppa et al., *Plant Physiology* 84:965-968 (1987). Una realización de la invención puede ser una forma rápida para evaluar los efectos de secuencias de potenciador o de componente genético sobre la expresión de un gen de interés en transgénicos de línea estable formulando modelos predictivos a partir de datos cuantitativos y/o cualitativos derivados de la expresión transitoria usando los métodos descritos en el presente documento.

Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para formular modelos predictivos de los efectos del direccionamiento génico y la expresión de proteínas. Se sabe que existen diversos mecanismos para el direccionamiento de productos génicos en plantas y las secuencias que controlan el funcionamiento de estos mecanismos han sido caracterizadas con cierto detalle. Por ejemplo, el direccionamiento de productos génicos al cloroplasto está controlado por una secuencia de señal encontrada en el extremo amino de diversas proteínas que se escinde durante la importación de cloroplastos para dar la proteína madura (por ejemplo, Comai et al. *J. Biol. Chem.* 263: 15104-15109 (1988)). Estas secuencias de señal pueden fusionarse con los productos de gen heterólogo para efectuar la importación de productos heterólogos en el cloroplasto (van den Broeck, et al. *Nature* 313: 358-363 (1985)). El ADN que codifica secuencias de señal apropiadas puede aislarse del extremo 5' de los ADNc que codifican la proteína RUBISCO, la proteína CAB, la enzima EPSP sintasa, la proteína GS2 y muchas otras proteínas que se sabe que están localizadas en cloroplastos. Véase, por tanto, la sección titulada "Expression With Chloroplast Targeting" en el ejemplo 37 de la patente de EE.UU. N.º 5.639.949.

Los mecanismos anteriormente descritos para el direccionamiento celular pueden utilizarse no solo conjuntamente con sus promotores relacionados, sino también conjuntamente con promotores heterólogos para efectuar un objetivo de direccionamiento celular específico bajo la regulación transcripcional de un promotor que tiene un patrón de expresión diferente de aquél del promotor del que se deriva la señal de direccionamiento.

Con el fin de garantizar la localización en los plástidos es concebible usar uno de los siguientes péptidos de tránsito: la ferredoxina: NADP⁺ oxidoreductasa (FNR) plastídica de espinaca que se desvela en Jansen et al. (*Current*

Genetics 13 (1988), 517-522). En particular, puede usarse la secuencia que oscila de los nucleótidos -171 a 165 de la secuencia de ADNc desvelada en el presente documento, que comprende la región no traducida 5', además de la secuencia que codifica el péptido de tránsito. Otro ejemplo es el péptido de tránsito de la proteína cerosa de maíz que incluye los primeros 34 restos de aminoácidos de la proteína cerosa madura (Klosgen et al., Mol. Gen. Genet. 217 (1989), 155-161). También es posible usar este péptido de tránsito sin los primeros 34 aminoácidos de la proteína madura. Además, pueden usarse los péptidos señal de la subunidad pequeña de ribulosa bisfosfato carboxilasa (Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Nawrath et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 12760-12764), de la NADP malato deshidrogenasa (Galiardo et al., Plant 197 (1995), 324-332), de la glutatión reductasa (Creissen et al., Plant J. 8 (1995), 167-175) o de la proteína R1 Lorberth et al. (Nature Biotechnology 16, (1998), 473-477).

Pueden incluirse supresores del silenciamiento génico dentro del casete de expresión para aumentar la expresión génica. Se conoce en la técnica que la inclusión de tales supresores del silenciamiento génico puede aumentar la expresión génica transitoria en dicotiledóneas (véase por ejemplo, Voinnet et al., 2003, Plant J., 33, 549-556).

No hay limitación preconcebida a los tipos de proteínas que pueden usarse en la invención descrita en el presente documento.

En un aspecto, los métodos se ponen en práctica con secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas deseadas, en los que las secuencias de ácidos nucleicos se diseñan para proporcionar codones preferidos por la planta que se usan para la transformación transitoria. Están disponibles características de uso de los codones para varias plantas y se describen en Wada et al., "Codon Usage Tabulated From the GenBank Genetic Sequence Data", Nucleic Acids Research 19: 1981-1986 (1991).

En un aspecto no es necesario que el casete de expresión contenga un marcador de selección y/o no se requiere que la construcción de ADN carezca de genes inductores de tumor.

En la presente invención pueden usarse marcadores de selección para permitir la selección de plantas y tejido de planta transitoriamente transformados. Puede desearse emplear un gen marcador de selección o detectable como, o además de, el gen expresable de interés. "Genes marcadores" son genes que confieren un fenotipo distinto a células que expresan el gen marcador y así permiten que tales células transformadas se distingan de células que no tienen el marcador. Tales genes pueden codificar tanto un marcador de selección como detectable, dependiendo de si el marcador confiere un rasgo que puede seleccionarse o no por medios químicos, es decir, mediante el uso de un agente selectivo (por ejemplo, un herbicida, antibiótico, o similares), o si es simplemente un rasgo que puede identificarse mediante observación o prueba, es decir, detectando (por ejemplo, el rasgo del locus R). Por supuesto, se conocen muchos ejemplos de genes marcadores adecuados en la técnica y pueden emplearse en la práctica de la invención.

Dentro de los términos genes marcadores de selección o detectables también están genes que codifican un "marcador secretable" cuya secreción puede detectarse como un medio de identificación o selección para células transitoriamente transformadas. Ejemplos incluyen marcadores que codifican un antígeno secretable que puede identificarse por interacción de anticuerpos, o incluso enzimas secretables que pueden detectarse por su actividad catalítica. Las proteínas secretables se clasifican en varias clases, que incluyen proteínas detectables difusibles pequeñas, por ejemplo, por ELISA; enzimas activas pequeñas detectables en disolución extracelular (por ejemplo, α -amilasa, β -lactamasa, fosfotricina acetiltransferasa); y proteínas que se insertan o atrapan en la pared celular (por ejemplo, proteínas que incluyen una secuencia conductora tal como la encontrada en la unidad de expresión de extensina o PR-S de tabaco).

Con respecto a marcadores secretables de selección, se considera que es particularmente ventajoso el uso de un gen que codifica una proteína que llega a ser secuestrada en la pared celular, y proteína que incluye un único epítipo. Un marcador de antígeno secretado tal emplearía idealmente una secuencia de epítipo que proporcionaría bajo ruido de fondo en tejido de planta, una secuencia conductora de promotor que conferiría expresión eficiente y direccionamiento a través de la membrana plasmática, y produciría proteína que está unida en la pared celular y todavía accesible a anticuerpos. Una proteína de pared normalmente secretada modificada para incluir un epítipo único satisficaría todos aquellos requisitos.

Un ejemplo de una proteína adecuada para modificación de este modo es la extensina, o glucoproteína rica en hidroxiprolina (HPRG). Por ejemplo, la molécula de HPRG de maíz (Steifel et al., The Plant Cell, 2:785 (1990)) está bien caracterizada en términos de biología molecular, expresión y estructura de proteína. Sin embargo, podrían modificarse una cualquiera de una variedad de extensinas y/o proteínas de la pared ricas en glicina (Keller et al., EMBO Journal, 8:1309 (1989)) mediante la adición de un sitio antigénico para crear un marcador detectable.

a. Marcadores de selección

Posibles marcadores de selección para su uso a propósito de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, un gen neo o nptII (Potrykus et al., Mol. Gen. Genet., 199:183 (1985)) que codifica resistencia a kanamicina y puede seleccionarse para usar kanamicina, G418, y similares; un gen bar que confiere resistencia al herbicida fosfotricina; un gen que codifica una proteína EPSP sintasa alterada (Hinchee et al., Biotech., 6:915 (1988)), confiriendo así

resistencia a glifosato; un gen de nitrilasa tal como bxn de *Klebsiella ozaenae* que confiere resistencia a bromoxinilo (Stalker et al., Science, 242:419 (1988)); un gen de acetolactato sintasa (ALS) mutante que confiere resistencia a imidazolinona, sulfonilurea u otros productos químicos inhibidores de ALS (solicitud de patente europea 154.204, 1985); un gen de DHFR resistente a metotrexato (Thillet et al., J. Biol. Chem., 263:12500 (1988)); un gen de dalapon deshalogenasa que confiere resistencia al herbicida dalapon; un gen de fosfomanosa isomerasa (PMI); un gen de antranilato sintasa mutado que confiere resistencia a 5-metil-triptófano; el gen hph que confiere resistencia al antibiótico higromicina; o el gen de manosa-6-fosfato isomerasa (también denominado en el presente documento el gen de fosfomanosa isomerasa), que proporciona la capacidad de metabolizar manosa (las patentes de EE.UU. N.º 5.767.378 y 5.994.629). Un experto en la materia es capaz de seleccionar un gen marcador de selección adecuado para su uso en la presente invención. Donde se emplea un gen de EPSP sintasa mutante, puede alcanzarse beneficio adicional mediante la incorporación de un péptido de tránsito de cloroplastos adecuado, CTP (solicitud de patente europea 0.218.571, 1987).

Una realización ilustrativa de un gen marcador de selección capaz de ser usado en sistemas para seleccionar transformantes son los genes que codifican la enzima fosfinotricina acetiltransferasa, tal como el gen bar de *Streptomyces hygroscopicus* o el gen pat de *Streptomyces viridochromogenes*. La enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) inactiva el principio activo en el herbicida bialafos, fosfinotricina (PPT). PPT inhibe la glutamina sintetasa (Murakami et al., Mol. Gen. Genet., 205:42 (1986); Twell et al., Plant Physiol., 91:1270 (1989)), causando la rápida acumulación de amoníaco y muerte celular. El éxito en el uso de este sistema selectivo conjuntamente con monocotiledóneas fue particularmente sorprendente debido a las importantes dificultades que se han informado en la transformación de cereales (Potrykus, Trends Biotech., 7:269 (1989)).

Donde se desee emplear un gen de resistencia a bialafos en la práctica de la invención, un gen particularmente útil para este fin es los genes bar o pat obtenibles de especies de *Streptomyces* (por ejemplo, ATCC N.º 21.705). Se ha descrito la clonación del gen bar (Murakami et al., Mol. Gen. Genet., 205:42 (1986); Thompson et al., EMBO Journal, 6:2519 (1987)) ya que tiene el uso del gen bar en el contexto de plantas distintas de monocotiledóneas (De Block et al., EMBO Journal, 6:2513 (1987); De Block et al., Plant Physiol., 91:694 (1989)).

b. Marcadores detectables

Marcadores detectables que pueden emplearse incluyen, pero no se limitan a, un gen de glucuronidasa o uidA (GUS) que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos; un gen del locus R, que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos de planta (Dellaporta et al., en Chromosome Structure and Function, pp. 263-282 (1988)); un gen de β -lactamasa (Sutcliffe, PNAS USA, 75:3737 (1978)), que codifica una enzima para la que se conocen diversos sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica); un gen xyle (Zukowsky et al., PNAS USA, 80:1101 (1983)) que codifica una catecol dioxigenasa que puede convertir catecoles cromogénicos; un gen α -amilasa (Ikuta et al., Biotech., 8:241 (1990)); un gen de tirosinasa (Katz et al., J. Gen. Microbiol., 129:2703 (1983)) que codifica una enzima capaz de oxidar tirosina a DOPA y dopaquinona que a su vez condensa para formar el compuesto fácilmente detectable melanina; un gen de β -galactosidasa, que codifica una enzima para la que hay sustratos cromogénicos; un gen de luciferasa (lux) (Ow et al., Science, 234:856 (1986)), que permite la detección de bioluminiscencia; o un gen de aecuorina (Prasher et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 126:1259 (1985)), que puede emplearse en la detección de bioluminiscencia sensible al calcio, o un gen de la proteína verde fluorescente (Niedz et al., Plant Cell Reports, 14: 403 (1995)).

Se contempla que genes del complejo del gen R de maíz son particularmente útiles como marcadores detectables. El complejo del gen R en maíz codifica una proteína que actúa regulando la producción de pigmentos de antocianina en la mayoría de las semillas y tejidos de planta. Un gen del complejo del gen R es adecuado para la transformación en maíz, debido a que la expresión de este gen en células transformadas no daña las células. Así, un gen R introducido en tales células producirá la expresión de un pigmento rojo y, si se incorpora establemente, puede ser visualmente puntuado como un sector rojo. Si una línea de maíz lleva alelos dominantes para genes que codifican los productos intermedios enzimáticos en la vía biosintética de antocianina (C2, A1, A2, Bz1 y Bz2), pero lleva un alelo recesivo en el locus R, la transformación de cualquier célula a partir de esa línea con R producirá la formación de pigmento rojo. Líneas a modo de ejemplo incluyen Wisconsin 22 que contiene el alelo rg-Stadler y TR112, un derivado de K55 que es r-g, b, Pl. Alternativamente puede utilizarse cualquier genotipo de maíz si los alelos C1 y R se introducen juntos. Otro marcador detectable contemplado para su uso en la presente invención es la luciferasa de luciérnaga, codificada por el gen lux. La presencia del gen lux en células transformadas puede detectarse usando, por ejemplo, película de rayos X, recuento por centelleo, espectrofotometría fluorescente, cámara de vídeo de luz baja, cámaras de recuento de fotones o luminometría multipocillo. También se prevé que este sistema pueda desarrollarse para la detección de poblaciones para bioluminiscencia, tal como sobre placas de cultivo de tejido, o incluso para la detección de plantas enteras.

Los polinucleótidos usados para transformar la planta pueden incluir, pero no se limitan a, ADN de genes de planta y genes no de planta tales como aquellos de bacterias, levaduras, animales o virus. El ADN introducido puede incluir genes modificados, porciones de genes, o genes quiméricos, que incluyen genes del mismo genotipo o diferente. El término "gen quimérico" o "ADN quimérico" se define como un gen o secuencia de ADN o segmento que comprende al menos dos secuencias de ADN o segmentos de especies que no combinan ADN bajo condiciones naturales, o

cuyas secuencias de ADN o segmentos están posicionados o unidos de un modo que normalmente no se produce en el genoma nativo de la planta no transformada.

Puede formularse un modelo predictivo transitorio para evaluar los efectos de la inhibición génica. Los términos "inhibir", "inhibición", "regulación por disminución" e "inhibición", como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier disminución en la expresión o función de un producto de gen diana, que incluye cualquier reducción relativa en la expresión o función hasta y que incluye la supresión completa de la expresión o función del producto de gen diana.

La inhibición de la expresión o función de un producto de gen diana (es decir, un producto génico de interés) puede ser en el contexto de una comparación entre dos plantas cualquiera, por ejemplo, expresión o función de un producto de gen diana en una planta genéticamente alterada frente a la expresión o función de ese producto de gen diana en una planta no mutante correspondiente. Alternativamente, la inhibición de expresión o función del producto de gen diana puede ser en el contexto de una comparación entre células vegetales, orgánulos, órganos, tejidos, o partes de planta dentro de la misma planta o entre plantas, e incluye comparaciones entre estadios de desarrollo o temporales dentro de la misma planta o entre plantas.

Métodos de inhibición o eliminación de la expresión de un gen en una planta son muy conocidos en la técnica, y puede usarse cualquier método tal en los métodos de la presente invención. Pueden utilizarse construcciones antisentido, complementarias a al menos una porción del ARN mensajero (ARNm) para la secuencia diana. Se construyen nucleótidos antisentido para hibridarse con el ARNm correspondiente. Pueden hacerse modificaciones de las secuencias antisentido en tanto que las secuencias se hibriden con e interfieran con la expresión del ARNm correspondiente. De este modo, pueden usarse construcciones antisentido que tienen al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 % o identidad de secuencia más alta con las secuencias sentido correspondientes. Además, pueden usarse porciones de los nucleótidos antisentido para alterar la expresión del gen diana. Generalmente, pueden usarse secuencias de al menos aproximadamente 10 nucleótidos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos, al menos aproximadamente 30 nucleótidos, al menos aproximadamente 40 nucleótidos, al menos aproximadamente 50 nucleótidos, al menos aproximadamente 100 nucleótidos, al menos aproximadamente 200 nucleótidos, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 450, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 550, o más. Se conocen en la técnica métodos antisentido, véanse, por ejemplo, Sheehy et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8805-8809; y las patentes de EE.UU. N.º 5.107.065; 5.453.566; y 5.759.829; incorporadas en el presente documento por referencia.

También puede usarse co-supresión para suprimir la expresión del gen diana. De este modo, una secuencia de gen heterólogo se expresa en una planta de interés en la orientación sentido para suprimir la expresión del gen endógeno en la planta. Se conocen en la técnica métodos para la co-supresión. Véanse, por ejemplo, Taylor (1997) Plant Cell 9:1245; Jorgensen (1990) Trends Biotech. 8(12):340-344; Jorgensen et al. (1996) Plant Mol. Biol. 31:957-973; Johansen y Carrington (2001) Plant Physiol. 126:930-938; Broin et al. (2002) Plant Cell 14:1417-1432; Stoutjesdijk et al (2002) Plant Physiol. 129:1723-1731; Yu et al. (2003) Phytochemistry 63:753-763; Flavell (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3490-3496; Finnegan et al. (1994) Bio/Technology 12:883-888; Neuberger et al. (1994) Mol. Gen. Genet. 244:230-241; y las patentes de EE.UU. N.º 5.034.323, 5.283.184 y 5.942.657; todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

La co-supresión implica transformar plantas con una construcción de ADN que comprende un promotor que conduce la expresión en una planta operativamente unida a al menos una porción de un polinucleótido que se corresponde con el transcrito del gen de interés o el gen diana. La secuencia de nucleótidos se construye o elige para tener identidad de secuencia sustancial con la secuencia del transcrito del gen endógeno, normalmente superior a aproximadamente el 60 % de identidad de secuencia, más normalmente superior a aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia, más normalmente superior a aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia, y en algunos casos superior a aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia.

También puede usarse interferencia por ARN (iARN) para regular por disminución genes. Véanse, generalmente, Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; patente de EE.UU. N.º 5.034.323; Sharp (1999) Genes Dev. 13:139-141; Zamore et al. (2000) Cell 101:25-33; y Montgomery et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15502-15507. En iARN, pueden usarse ARN bicatenarios (ARNbc) largos, normalmente >200 nucleótidos, para silenciar la expresión de un gen diana en una planta. Tras la introducción, los ARNbc largos entran en una vía celular que comúnmente se denomina la vía de interferencia por ARN (iARN). Primero, los ARNbc se procesan en ARN interferentes pequeños (ARNip) de 20-25 nucleótidos (nt) por una enzima similar a RNasa III. Estos ARNip se ensamblan en complejos que contienen endorribonucleasa conocidos como complejos de silenciamiento inducido por ARN (RISCs), que se desenrollan en el proceso. Las hebras de ARNip guían posteriormente a los RISCs a moléculas de ARN complementarias, donde escinden y destruyen el ARN relacionado. La escisión de ARN relacionado tiene lugar cerca del centro de la región unida por la hebra de ARNip.

De este modo, puede usarse interferencia por ARN bicatenario (ARNbc). Para interferencia por ARNbc, una molécula de ARN sentido y una antisentido que es completamente o parcialmente complementaria a la molécula de

ARN sentido se expresan en la misma célula, produciendo la inhibición de la expresión del ARN mensajero endógeno correspondiente.

Las moléculas sentido y antisentido pueden expresarse a partir de un casete de expresión único o separado. Alternativamente, se criban entonces múltiples líneas de plantas transformadas con el casete de expresión o casetes de expresión de interferencia por ARNbc para identificar líneas de plantas que muestran la mayor inhibición de la expresión génica. Métodos de uso de interferencia por ARNbc para inhibir la expresión de genes de planta endógenos se describen en Waterhouse et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13959-13964, Liu et al. (2002) Plant Physiol. 129:1732-1743, y los documentos WO 99/49029, WO 99/53050, WO 99/61631 y WO 00/49035; cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia.

10 La inhibición de la expresión de un gen puede obtenerse por interferencia por ARN de horquilla (ARNh) o interferencia por ARN de horquilla que contiene intrón (ARNhi). Un ARN de horquilla corta (ARNhc) es una secuencia de ARN que hace un ajustado giro de horquilla que puede usarse para silenciar la expresión génica. Estos métodos son altamente eficaces en la inhibición de la expresión de genes endógenos. Véase Waterhouse y Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 4:29-38 y las referencias citadas en su interior.

15 Para la interferencia por ARNh, el casete de expresión se diseña para expresar una molécula de ARN que se hibrida consigo mismo para formar una estructura de horquilla que comprende una región de bucle monocatenaria y un tallo de bases apareadas. La región de tallo de bases apareadas comprende una secuencia sentido correspondiente a toda o parte del ARN mensajero endógeno que codifica el gen cuya expresión va a inhibirse, y una secuencia antisentido que es completamente o parcialmente complementaria a la secuencia sentido. Así, la región de tallo de bases apareadas de la molécula generalmente determina la especificidad de la interferencia por ARN. Las moléculas de ARNh son altamente eficientes en inhibir la expresión de genes endógenos, y la interferencia por ARN que inducen se hereda por generaciones posteriores de plantas. Véase, por ejemplo, Chuang y Meyerowitz (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4985-4990; Stoutjesdijk et al. (2002) Plant Physiol. 129:1723-1731; y Waterhouse y Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 4:29-38. Métodos de uso de interferencia por ARNh para inhibir o silenciar la expresión de genes se describen, por ejemplo, en Chuang y Meyerowitz (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4985-4990; Stoutjesdijk et al. (2002) Plant Physiol. 129:1723-1731; Waterhouse y Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 4:29-38; Pandolfini et al. BMC Biotechnology 3:7, y la publicación de patente de EE.UU. N.º 20030175965; cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Un ensayo transitorio para la eficiencia de construcciones de ARNh para silenciar la expresión génica *in vivo* se ha descrito por Panstruga et al. (2003) Mol. Biol. Rep. 30:135-140, incorporado en el presente documento por referencia.

También puede usarse ARN de horquilla interferente (ARNhi) en los métodos de la invención. Los ARNhi tienen la misma estructura general que para ARNh, pero la molécula de ARN comprende además un intrón que es capaz de ser cortado y empalmado en la célula en la que se expresa el ARNhi. El uso de un intrón minimiza el tamaño del bucle en la molécula de ARN de horquilla tras el corte y empalme, aumentando así la eficiencia de interferencia. Véase, por ejemplo, Smith et al. (2000) Nature 407:319-320. Métodos de uso de interferencia por ARNhi para inhibir la expresión de genes de planta endógenos se describen, por ejemplo, en Smith et al. (2000) Nature 407:319-320; Wesley et al. (2001) Plant J. 27:581-590; Wang y Waterhouse (2001) Curr. Opin. Plant Biol. 5:146-150; Waterhouse y Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 4:29-38; Helliwell y Waterhouse (2003) Methods 30:289-295, y la publicación de patente de EE.UU. N.º 20030180945, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Véase también el documento WO 02/00904, donde el ARNh se diseña de forma que la región de bucle determine la especificidad de la interferencia por ARN.

Puede usarse interferencia por ARN por expresión transitoria de un gen que codifica un microARN (miARN). Los miARN son agentes reguladores que consisten en aproximadamente 22 ribonucleótidos. Los miARN son altamente eficientes en inhibir la expresión de genes endógenos. Véase, por ejemplo, Javier et al. (2003) Nature 425: 25 7-263.

45 Para interferencia por miARN, el casete de expresión se diseña para expresar una molécula de ARN que se modela en un gen de miARN endógeno. El gen de miARN codifica un ARN que forma una estructura de horquilla que contiene aproximadamente una secuencia de 22 nucleótidos que es complementaria al transcrito diana. Por ejemplo, se selecciona una secuencia de 22 nucleótidos de una secuencia de transcrito diana y contiene 22 nucleótidos de dicha secuencia diana en orientación sentido y 22 nucleótidos de una secuencia antisentido correspondiente que es complementaria a la secuencia sentido.

Otros métodos para regular por disminución la actividad de una proteína diana incluyen silenciamiento de genes inducido por virus (Burton et al. (2000) Plant Cell 12:691-705; y Baulcombe (1999) Curr. Op. Plant Bio. 2:109-113); ribozimas (Steinecke et al. (1992) EMBO J. 11:1525; y Perriman et al. (1993) Antisense Res. Dev. 3:253); modificación dirigida mediada por oligonucleótido (por ejemplo, documentos WO 03/076574 y WO 99/25853); moléculas dirigidas por dedo de Zn (por ejemplo, documentos WO 01/52620; WO 03/048345; y WO 00/42219); marcado de transposones (Maes et al. (1999) Trends Plant Sci. 4:90-96; Dharmapuri y Sonti (1999) FEMS Microbiol. Lett. 179:53-59; Meissner et al. (2000) Plant J. 22:265-274; Phogat et al. (2000) J. Biosci. 25:57-63; Walbot (2000) Curr. Opin. Plant Biol. 2:103-107; Gai et al. (2000) Nucleic Acids Res. 28:94-96; Fitzmaurice et al. (1999) Genetics 153:1919-1928; Bensen et al. (1995) Plant Cell 7:75-84; Mena et al. (1996) Science 274:1537-1540; y la patente de EE.UU. N.º 5.962.764).

Además, pueden usarse moléculas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos que reconocen específicamente proteínas, u homólogos de las mismas, según la invención en una célula de planta, es decir, fragmentos específicos o epítopes de una proteína tal, para inhibir la actividad de esta proteína. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales o anticuerpos sintéticos, además de fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, Fv o scFv, etc. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales, por ejemplo, por las técnicas que se describieron originalmente en Kohler y Milstein (Nature 256 (1975), 495) y Galfre (Meth. Enzymol. 73 (1981) 3), que comprenden la fusión de células de mieloma de ratón con células del bazo derivadas de mamíferos inmunizados. Además, pueden obtenerse anticuerpos o fragmentos de los mismos para los péptidos anteriormente mencionados usando métodos que se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Puede lograrse la expresión de anticuerpos o moléculas similares a anticuerpo en plantas por métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, se han expresado satisfactoriamente anticuerpos de tamaño completo (During, Plant. Mol. Biol. 15 (1990), 281-293; Hiatt, Nature 342 (1989), 469-470; Voss, Mol. Breeding 1 (1995), 39-50), fragmentos Fab (De Neve, Transgenic Res. 2 (1993), 227-237), scFvs (Owen, Bio/Technology 10 (1992), 790-794; Zimmermann, Mol. Breeding 4 (1998), 369-379; Tavladoraki, Nature 366 (1993), 469-472) y dAbs (Benvenuto, Plant Mol. Biol. 17 (1991), 865-874) en tabaco, patata (Schouten, FEBS Lett. 415 (1997), 235-241) o *Arabidopsis*, alcanzado niveles de expresión de hasta el 6,8 % de la proteína total (Fiedler, Immunotechnology 3 (1997), 205-216).

Además, pueden usarse moléculas de ácidos nucleicos que codifican una forma mutante de una proteína (por ejemplo, una enzima) según la invención para interferir con la actividad de la proteína natural. Una forma de mutante tal ha perdido preferentemente su actividad y puede derivarse de la proteína natural correspondiente a modo de delección (delecciones), sustitución (sustituciones) y/o adiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Formas mutantes de tales proteínas pueden mostrar, además de la pérdida de actividad, un aumento de la afinidad por sustrato y/o una elevada estabilidad en la célula, por ejemplo, debido a la incorporación de aminoácidos que estabilizan las proteínas en el entorno celular. Estas formas mutantes pueden ser mutantes que existen de forma natural o, como se prefiere, genéticamente manipulados.

Transformación en plantas

Una vez se ha clonado un casete de expresión, gen y/o componente génico de interés en un sistema de expresión, se transforma en una célula de planta. El casete de expresión, gen y o componente génico puede expresarse transitoriamente o establemente en la planta. El término "introducir", en el contexto de un polinucleótido, por ejemplo, una construcción de nucleótidos de interés, pretende significar presentar a la planta el polinucleótido en una manera tal que el polinucleótido acceda al interior de una célula de la planta. Donde va a introducirse más de un polinucleótido, estos polinucleótidos pueden ensamblarse como parte de una construcción de nucleótido único, o como construcciones de nucleótidos separadas, y puede localizarse en los mismos vectores de transformación o diferentes. Por consiguiente, pueden introducirse polinucleótidos en la célula huésped de interés en un único evento de transformación, en eventos de transformación separados, o, por ejemplo, en plantas, como parte de un protocolo de cultivo. Los métodos de la invención no dependen de un método particular para introducir uno o más polinucleótidos en una planta, solo que el (los) polinucleótido(s) accedan al interior de al menos una célula de la planta.

a. Transformación en plantas transitoria

Los métodos en el presente documento se refieren a métodos para expresar transitoriamente un casete de expresión, gen y/o componente genético de interés *in planta* con el fin de formular modelos predictivos para cómo dicho gen de casete de expresión y/o componente genético de interés rendirán en plantas transgénicas estables. La aplicación temprana de infiltración de *Agrobacterium* (Agro-infiltración) para la expresión transitoria se basó en álamo y *Phaseolus* (Kapila *et al.*, 1997), y entonces después se extendió a tabaco (Vaquero *et al.*, 1999). La expresión transitoria de genes en plantas ha sido conocida en la técnica como se describe antes, véase Fischer *et al.*, 1999, Biotechnol. Appl. Biochem., 30, 113-116, para una revisión. Sin embargo, los anteriores métodos de ensayo transitorio han estado limitados en su capacidad para formar modelos predictivos de cómo un gen relevante, casete de expresión y/o componente genético de interés rendirán en líneas transgénicas estables. Por tanto, hay limitaciones que incluyen, pero no se limitan a: el número de días que una proteína se expresará transitoriamente, la cantidad de proteína capaz de ser expresada, consistencia en el análisis, además de la longitud, del gen que va a expresarse transitoriamente. Los métodos desvelados en el presente documento pueden vencer estas limitaciones. Además, la invención proporciona un proceso sustancialmente mejorado para producir proteínas *in planta*, usando plantas comercialmente disponibles sin la necesidad de tener instalaciones de crecimiento de plantas. El método puede usarse para producir al menos aproximadamente 0,1-1,0 mg, al menos aproximadamente 5 mg, o al menos aproximadamente 10 mg de proteína para el análisis. En una realización, tejido de hoja de 1-7 días de edad se agro-infiltra con un vector binario que comprende un casete de expresión que comprende un promotor, un intrón y un gen de interés. En algunas realizaciones, el casete de expresión puede comprender potenciadores traduccionales y/o transcripcionales. En otra realización, el tejido de hoja de planta es un tejido de hoja de planta de maíz que tiene 1-7 días de edad tras la agro-infiltración. En algunas realizaciones, la agro-infiltración puede llevarse a cabo en tejido de planta de 1-20 días de edad.

En una realización, se usan células de *Agrobacterium* que llevan un casete de expresión con un gen heterólogo o genes de interés para administrar el gen heterólogo o genes a un tejido de planta para la expresión transitoria en las células y/o espacios extracelulares del tejido de planta. Generalmente, una construcción de expresión adecuada comprende: al menos una secuencia frontera de T-ADN, una secuencia reguladora (por ejemplo promotor) y un gen de interés operativamente unido a la secuencia de control reguladora. En un aspecto, una construcción de expresión es parte de un vector que comprende uno o más orígenes de replicación, al menos un origen de replicación adecuado para replicar el vector que comprende el casete de expresión en *Agrobacterium*.

Cultivos de células de *Agrobacterium* que comprenden los casetes de expresión descritos en el presente documento se infiltran en tejido de planta. En realizaciones preferidas, los casetes de expresión se infiltran en tejido de hoja de planta intacto de 1-7 días de edad. Preferentemente, la infiltración se produce en presencia de un vacío. Después de incubar el tejido de planta bajo condiciones adecuadas que permiten que el casete de expresión exprese la proteína en una pluralidad de células vegetales, la proteína o subproductos de sustrato de proteína pueden aislarse de las células. El método requiere poner en contacto el tejido de planta con *Agrobacterium* que comprende un vector binario que comprende un casete de expresión que va a expresarse transitoriamente en células vegetales, infiltrando el tejido de planta con dicho *Agrobacterium* que comprende un casete de expresión que va a expresarse transitoriamente en células vegetales para obtener rendimiento de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 500 mg de una proteína relevante. Si se necesita más proteína para formular modelos predictivos, pueden realizarse una o más rondas adicionales de agro-infiltración y purificación o más preferentemente puede usarse tejido de planta más intacto.

El *Agrobacterium* usado puede ser no mutante (por ejemplo, virulento) o desarmado. Pueden usarse múltiples cepas de *Agrobacterium*, expresando cada una un gen diferente, para producir las proteínas individuales o proteínas heteromultímeras (por ejemplo, anticuerpo) o para reproducir una vía, tal como una vía metabólica, una vía de síntesis química o una vía de señalización. Alternativamente, o adicionalmente, una cepa de *Agrobacterium* individual puede comprender una pluralidad de secuencias que comprenden diferentes genes heterólogos para evaluar interacciones. En una realización, al menos una cepa de *Agrobacterium* comprende *Agrobacterium tumefaciens*.

Se ha documentado bien la transformación de una planta con *Agrobacterium* y su uso en la generación de transgénicos de planta estables. La interacción de una célula de *Agrobacterium* que comprende una secuencia frontera de T-ADN con una célula de planta produce la transferencia de una copia de hebra única de T-ADN de *Agrobacterium* complejado con proteínas al núcleo de planta. Para la transformación estable, el T-ADN se integra en el ADN nuclear. Aunque el proceso es evidentemente bastante eficiente, las copias no integradas de T-ADN son capaces de ser transitoriamente transcritas, produciendo la expresión a corto plazo de los genes de T-ADN y cualquier otro gen que sea co-transformado. Como la expresión transitoria no depende de la integración de ADN o regeneración de plantas, es posible usar las cepas más virulentas de *Agrobacterium* sin la necesidad de usar vectores desarmados (es decir, vectores que ya no contienen genes inductores de tumor), aunque los últimos también pueden usarse.

Cepas de *Agrobacterium* adecuadas incluyen cepas no mutantes (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens*) o cepas en las que uno o más genes están mutados para aumentar la eficiencia de transformación, por ejemplo, tal como cepas de *Agrobacterium* en las que la expresión del gen *vir* y/o la inducción del mismo está alterada debido a la presencia de genes *virA* o *virG* mutantes o quiméricos (por ejemplo, Chen y Winans, 1991, J. Bacteriol. 173: 1139-1144; y Scheeren-Groot et al., 1994, J. Bacteriol. 176: 6418-6246). En otra realización, la cepa de *Agrobacterium* puede comprender una copia de gen *virG* adicional, tal como el gen super *virG* derivado de pTiBo542, preferentemente unido a un plásmido de múltiples copias como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 6.483.013.

Es bien entendido en la materia que *Agrobacterium* puede transformarse con un vector binario de interés dado usando, por ejemplo, electroporación o inducción química. Véase, por ejemplo, Mersereau M., Pazour G.J., Das A. 1990. Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. Gene 90: 149-151 o R. Nishiguchi et al. (1987) Mol. Gen. Genetics 206 1-8.

Otras cepas de *Agrobacterium* adecuadas incluyen, pero no se limitan a: C58C1 de *A. tumefaciens* (Van Larebeke et al., Nature 252: 169-170 (1974)), A136 (Watson et al., J. Bacteriol 123: 255-264 (1975)), LBA401 (Klapwijk et al., J Bacteriol 141: 128-136 (1980)), LBA4404 (Hoekema et al., Nature 303: 179-180 (1983)), EHA101 (Hood et al., J. Bacteriol. 168: 1291-1301 (1986)), EHA105 (Hood et al., Trans. Res. 2: 208-218 (1993)), AGL1 (Lazo et al., Bio/Technology 2: 963-967 (1991)) y A281 (Hood et al., arriba (1986)).

Los cultivos de *Agrobacterium* (es decir, que comprenden un casete de expresión según la invención) se cultivan durante aproximadamente dos días en medio YEB o cualquier variación del mismo (por ejemplo, extracto de levadura 6 g/l, peptona 5 g/l, sulfato de magnesio 2 mM y sacarosa 5 g/l) complementado con antibióticos apropiados para seleccionar determinantes de resistencia encontrados en los vectores y el huésped. Para cultivar células para la expresión transitoria, los cultivos de *Agrobacterium* iniciadores pueden diluirse 1:50 en medio YEB fresco. Pueden añadirse antibióticos, tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 5,8) y acetosiringona 20 µM. Después de 18-24 horas de incubación a 28 °C, las células alcanzan una absorbancia (también denominada densidad óptica o

D.O.) a 600 nm de 2,5-3,5. Las células se diluyen preferentemente a una absorbancia a 600 nm de 2,5, si fuera necesario, usando medio YEB.

Los cultivos de *Agrobacterium* (es decir, que comprenden un casete de expresión según la invención) se cultivan durante aproximadamente 24-48 horas en medio LB o cualquier variación del mismo y se complementan con antibióticos apropiados para seleccionar determinantes de resistencia encontrados en los vectores y el huésped. Para cultivar células para la expresión transitoria, los cultivos de *Agrobacterium* iniciadores pueden diluirse 1:50 en medio LB fresco. Pueden añadirse antibióticos, MES 10 μM (pH 5,6) y acetosiringona 100 μM . Las *Agrobacterias* se cultivan en un agitador durante la noche a 250 rpm. Después de 18-24 horas de incubación a 28 °C, las células alcanzan una absorbancia (también denominada densidad óptica o D.O.) a 600 nm de 2,5-3,5. Las células se diluyen preferentemente a una absorbancia a 600 nm de 2,5, si fuera necesario, usando medio LB. Tras la incubación, las *Agrobacterias* se sedimentan por centrifugación a 4000 g durante 10 minutos. Los sedimentos pueden entonces resuspendirse en medio de infección (sales de Murashige y Skoog con vitaminas, 2 % de sacarosa, MES 500 μM (pH 5,6), MgSO_4 10 μM y acetosiringona 100 μM) a D.O. de 600 nm igual a 0,5 y posteriormente se mantienen a 28 °C durante 2-3 horas.

Una realización de la invención es que tras el crecimiento y la preparación de cultivos de *Agrobacterium* que comprenden un vector binario que comprende un casete de expresión según la invención, puede llevarse a cabo la infiltración de hojas intactas individuales. La agro-infiltración se lleva a cabo preferentemente en plantas receptoras de 1-9 días de edad. Más preferentemente, la agro-infiltración se lleva a cabo en plantas de 3-7 días de edad o lo más preferible plantas de 7 días de edad usando una jeringa de 5 ml presionando la punta de la jeringa (sin una aguja) contra la parte inferior de la superficie de la hoja. El cultivo de *Agrobacterium* se filtra entonces en el espacio extracelular de las células vegetales localizadas donde el casete de expresión puede con el tiempo entrar en la célula de planta y traducirse en una proteína. Las plantas infiltradas pueden mantenerse a aproximadamente 25 °C con un fotoperiodo de ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. El tejido de hoja puede analizarse entre 1-10 días después de la agro-infiltración, más preferentemente 3-7 días, y lo más preferentemente 7 días después de la agro-infiltración. En una realización preferida, el tejido de hoja monocotiledónea se agro-infiltra como se describe en el presente documento y en una realización más preferida el tejido de hoja de maíz puede ser agro-infiltrado como se describe en el presente documento.

La invención engloba además métodos de expresar transitoriamente una secuencia de nucleótidos de interés en una parte de planta que comprende las etapas de: a) agro-infiltración de un vector binario que comprende un casete de expresión que comprende al menos una secuencia de nucleótidos en una parte de planta; y b) expresar transitoriamente la al menos una secuencia de nucleótidos en la parte de planta. En realizaciones de la invención, el método comprende agro-infiltración de un casete de expresión que comprende al menos una secuencia de nucleótidos en una parte de planta *in planta*. Como es entendido por aquellos expertos en la materia, la agro-infiltración comprende generalmente la infiltración de un cultivo de *Agrobacterium* que comprende un vector binario que comprende el casete de expresión.

Los casetes de expresión y partes de planta se describen en más detalle en cualquier parte en el presente documento. En realizaciones de la invención, la parte de planta es tejido de hoja.

Además, la al menos una secuencia de nucleótidos de interés puede codificar una proteína o ARN funcional (cada uno como se describe en más detalle en cualquier parte en el presente documento).

En realizaciones representativas, la planta es una planta monocotiledónea, opcionalmente una planta de cereal. Plantas de cereal son como se describen en el presente documento e incluyen sin limitación: maíz, trigo, sorgo, cebada, mijo, avena, arroz y/o centeno. En realizaciones de la invención, la planta de cereal es una planta de maíz o una planta de sorgo. En realizaciones de la invención, la planta de cereal no es una planta de arroz.

En realizaciones a modo de ejemplo de la invención, el método puede llevarse a cabo ventajosamente en plantas relativamente jóvenes. Para ilustrar, la planta puede tener de aproximadamente 1 a aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 días de edad o cualquier subconjunto de los mismos, por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8 o 9 días de edad, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 6, 7, 8 o 9 días de edad. En realizaciones de la invención, la planta tiene aproximadamente 7 días de edad.

Como otras realizaciones a modo de ejemplo, una planta de cereal puede estar en aproximadamente el estadio de 1 hoja, 2 hojas, 3 hojas, 4 hojas, 5 hojas, 6 hojas o 7 hojas, o cualquier subconjunto de los mismos, por ejemplo, aproximadamente el estadio de 1 hoja a aproximadamente el estadio de 2 hojas, 3 hojas, 4 hojas, 5 hojas, 6 hojas o 7 hojas; aproximadamente el estadio de 2 hojas a aproximadamente el estadio de 3 hojas, 4 hojas, 5 hojas, 6 hojas o 7 hojas; aproximadamente el estadio de 3 hojas a aproximadamente el estadio de 4 hojas, 5 hojas, 6 hojas o 7 hojas. En realizaciones de la invención, la planta de cereal está en aproximadamente el estadio de 2 hojas o aproximadamente el estadio de 3 hojas. En realizaciones, la planta de cereal están en aproximadamente el estadio de 2 hojas. En realizaciones, la planta de cereal está en aproximadamente el estadio de 3 hojas.

Los estadios de desarrollo de maíz están bien definidos, y aquellos expertos en la materia son capaces de determinar los mismos. Por ejemplo, los estadios de desarrollo de maíz se han dividido en estadios vegetativos (V) y

reproductivos (R). Los estadios V pueden subdividirse en VE (emergencia), seguido de V1, V2, V3, V4, V5, V6, etc. a V(n), donde (n) representa el estadio de última hoja antes del desarrollo de panoja (VT) (Special Report No. 48, How a corn plant develops, Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension Service, Ames, IA (2005)). Los estadios de hoja se definen según la hoja más superior cuyo collar de hoja es visible; la primera parte del collar que es visible es la espalda, que aparece como una línea descolorida entre el limbo de la hoja y la vaina de la hoja (*Id.*). La primera hoja tiene generalmente una forma ovalada característica y puede usarse como punto de referencia para contar hacia arriba hasta el collar de hoja visible superior (*Id.*). Si se ha producido pérdida de hojas inferiores (generalmente empezando alrededor de V6), el tallo más bajo puede fraccionarse longitudinalmente y el primer nodo por encima del primer internodo de tallo alargado es generalmente el quinto nodo de la hoja, que puede usarse como punto de referencia (*Id.*). Esta nomenclatura ha sido desarrollada para maíz, pero puede generalizarse para otras plantas de cereal también, por ejemplo, para una planta de cereal en el estadio de 2 hojas, la hoja más superior es la segunda hoja, cuyo collar de hoja es visible, como se describe en más detalle anteriormente con respecto a V2.

Por consiguiente, con respecto particular a plantas de maíz, la planta de maíz puede estar en aproximadamente el estadio V1, V2, V3, V4, V5, V6 o V7, o cualquier subconjunto de los mismos, por ejemplo, aproximadamente el estadio V1 a aproximadamente el estadio V2, V3, V4, V5, V6 o V7; aproximadamente el estadio V2 a aproximadamente el estadio V3, V4, V5, V6 o V7; aproximadamente el estadio V3 a aproximadamente el estadio V4, V5, V6 o V7. En realizaciones de la invención, la planta de maíz está en aproximadamente el estadio V2 o aproximadamente el estadio V3. En realizaciones, la planta de maíz está en aproximadamente el estadio V2. En realizaciones, la planta de maíz está en aproximadamente el estadio V3.

El listado de estadios de planta, edad de la planta y otros intervalos descritos en el presente documento pretende ser incluyente. Por ejemplo, el término "estadio V1 a V3" (y términos similares) incluye los estadios V1, V2 y V3.

La agro-infiltración puede opcionalmente llevarse a cabo usando una jeringa. En realizaciones representativas, la jeringa es una jeringa sin aguja. En el caso de una jeringa sin una aguja, la punta de la jeringa puede colocarse contra el envés de la parte de planta (por ejemplo, una hoja, opcionalmente la superficie abaxial de la hoja). En una realización representativa, la jeringa es una jeringa de 5 mililitros. El cultivo de *Agrobacterium* puede entonces infiltrarse en la parte de planta, donde el casete de expresión puede con el tiempo entrar en la(s) célula(s) de planta y expresarse. Métodos de mantenimiento y recogida de tejido de plantas infiltradas se conocen en la técnica y se describen en el presente documento. En realizaciones de la invención, el método no comprende frotar la hoja (por ejemplo, como se describe por Grimsley et al., Nature 325:177-179 (1987)).

En realizaciones representativas, la invención puede proporcionar la ventaja de permitir que volúmenes de líquido más grandes se infiltren en la parte de planta. Este aspecto es particularmente deseable para la infiltración de cultivos bacterianos tales como cultivos de *Agrobacterium*. En realizaciones de la invención, el método comprende agro-infiltración de aproximadamente 0,1, 0,25 o 0,5 a aproximadamente 1, 2 o incluso 3 mililitros o más de un cultivo de *Agrobacterium* líquido que comprende el casete de expresión. Por ejemplo, de aproximadamente 0,25 o 0,5 a aproximadamente 1 o 2 mililitros de un cultivo de *Agrobacterium* que comprende un vector binario que comprende el casete de expresión pueden agro-infiltrarse en la parte de planta. A diferencia, en los métodos del estado de la técnica que utilizan vectores binarios que suministran un virus o vector de virus, el cultivo de *Agrobacterium* se inyectó (es decir, usando una aguja conectada a una jeringa) en hojas de maíz usando solo pequeños volúmenes (por ejemplo, 2 a 20 microlitros; véase, por ejemplo, Grimsley et al., Nature 325:177-179 (1987); Grimsley et al., Biotechnology 6:185-189 (1988); Martin et al., Virology 89:695-700 (1999)).

Facilitando la administración de volúmenes más grandes, la invención puede usarse ventajosamente para administrar vectores bacterianos (por ejemplo, *Agrobacteria*) que comprenden una secuencia de nucleótidos de interés a una parte de planta en planta. Por ejemplo, en realizaciones de la invención, el método permite agro-infiltración con un vector binario, en el que el vector binario no comprende un virus o vector de virus.

Evitando la necesidad de utilizar un sistema viral, la invención puede proporcionar otras ventajas también. Vectores virales, tales como el virus del estriado del maíz (MSV), son conocidos por tener limitaciones en el tamaño del ácido nucleico que pueden suministrar (Shene et al., Plant J. 5:227-236 (1994)). A diferencia, la presente invención puede usarse para administrar un casete de expresión que es mayor de aproximadamente 1, 1,5, 2, 3, 4 o 5 kilobases o incluso 10 kilobases y/o inferior a aproximadamente 7, 8, 9, 10, 12, 15 o 20 kilobases (incluyendo cualquier combinación de lo anterior en tanto que el límite inferior sea inferior al límite superior). En realizaciones de la invención, el método puede ponerse en práctica con casetes de expresión que están en el intervalo de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 kilobases de tamaño.

Según realizaciones representativas, la agro-infiltración de las hojas de una planta de cereal (por ejemplo, maíz) con una jeringa (por ejemplo, una jeringa sin aguja) en un único sitio puede producir la infiltración de al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 35 %, 50 % o más del tejido de hoja, normalmente limitada a un lado de la vena principal. Opcionalmente, al menos aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250 o 500 microlitros se infiltran en un único sitio. En realizaciones de la invención, dependiendo del tamaño de la hoja, la hoja entera puede infiltrarse moviendo la jeringa a tan solo 2, 3, 4, 5 o 6 sitios. Así, en realizaciones representativas, una hoja entera puede agro-infiltrarse usando una jeringa (por ejemplo, una jeringa sin aguja) según la presente invención en menos

de aproximadamente 30, 20, 15 o incluso 10 segundos. Dependiendo del tamaño de la hoja, normalmente se usan aproximadamente 0,25 o 0,5 a aproximadamente 1 o 2 mililitros de cultivo de *Agrobacterium* para infiltrar la hoja entera.

5 En algunas realizaciones, pueden usarse jeringas sin aguja para llevar a cabo la agro-infiltración sobre la parte inferior de tejido de hoja de planta joven. Por ejemplo, puede usarse una cualquiera de las siguientes jeringas sin aguja o equivalentes comerciales para poner en práctica las realizaciones de la invención como se describe en el presente documento: punta deslizante Tuberculine de 1 ml (Becton Dickinson Medical, Francia), jeringa de plástico Luer-slip de 5 ml (National Scientific), jeringa de plástico de punta Luer-lok de 5 ml, 10 ml o 60 ml (Becton Dickinson Medical, Francia).

10 Los métodos en el presente documento pueden usarse para pre-cribar vectores de expresión más adecuados para la expresión de proteínas en una planta en crecimiento. En un aspecto, el método se usa para cribar rápidamente variantes de componentes genéticos o secuencias reguladoras que proporcionan la óptima expresión de proteínas. Alternativamente, o adicionalmente, se criban secuencias de variante para identificar secuencias que codifican proteínas con elevada estabilidad (por ejemplo, termoestabilidad) u otras propiedades comerciales deseadas.

15 b. Transformación en plantas estable

La invención permite un método rápido de formulación de modelos predictivos expresando transitoriamente un casete de expresión, gen y/o componentes génicos *in planta*, y entonces recogiendo los datos cuantitativos y/o cualitativos que son predictivos de cómo dicho casete de expresión, gen y/o componentes génicos rendirían en líneas de plantas transgénicas estables. Numerosos vectores de transformación disponibles para la transformación en planta son conocidos para aquellos expertos habituales en las técnicas de transformación de plantas, y los genes relevantes para la presente invención pueden usarse conjuntamente con cualquiera de tales vectores. La selección de un vector dependerá de la técnica de transformación preferida y las especies diana para la transformación. Para ciertas especies diana, pueden preferirse diferentes marcadores de selección de antibióticos o herbicidas. Marcadores de selección usados rutinariamente en la transformación incluyen el gen *npII*, que confiere resistencia a kanamicina y antibióticos relacionados (Messing & Vierra. *Gene* 19: 259-268 (1982); Bevan et al., *Nature* 304:184-187 (1983)), el gen *bar*, que confiere resistencia al herbicida fosfotricina (White et al., *Nucl. Acids Res* 18: 1062 (1990), Spencer et al. *Theor. Appl. Genet* 79: 625-631 (1990)), el gen *hph*, que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Blochinger & Diggelmann, *Mol Cell Biol* 4: 2929-2931) y el gen *dhfr*, que confiere resistencia a metotrexato (Bourouis et al., *EMBO J.* 2(7): 1099-1104 (1983)), el gen EPSPS, que confiere resistencia a glifosato (patentes de EE.UU. N.º 4.940.935 y 5.188.642) y el gen de manosa-6-fosfato isomerasa, que proporciona la capacidad para metabolizar manosa (patentes de EE.UU. N.º 5.767.378 y 5.994.629).

Métodos para la regeneración de plantas también son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se han utilizado vectores plasmídicos Ti para la administración de ADN extraño, además de captación de ADN directa, liposomas, electroporación, microinyección y microproyectiles. Además, pueden utilizarse bacterias del género *Agrobacterium* para transformar células vegetales. A continuación hay descripciones de técnicas representativas para transformar tanto plantas dicotiledóneas como monocotiledóneas, además de una técnica de transformación de plástidos representativa.

40 Están disponibles muchos vectores para la transformación usando *Agrobacterium tumefaciens*. Estos llevan normalmente al menos una secuencia frontera de T-ADN e incluyen vectores tales como pBIN19 (Bevan, *Nucl. Acids Res.* (1984)). Para la construcción de vectores útiles en transformación de *Agrobacterium*, véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2006/0260011.

La transformación sin el uso de *Agrobacterium tumefaciens* elude el requisito de secuencias de T-ADN en el vector de transformación elegido y, por consiguiente, pueden utilizarse vectores que carecen de estas secuencias, además de vectores tales como los descritos anteriormente que contienen secuencias de T-ADN. Las técnicas de transformación que no se basan en *Agrobacterium* incluyen transformación mediante bombardeo de partículas, captación de protoplastos (por ejemplo, PEG y electroporación) y microinyección. La elección del vector depende ampliamente de la selección preferida para las especies que se transforman. Para la construcción de tales vectores, véase, por ejemplo, la solicitud de EE.UU. N.º 20060260011.

50 Para la expresión de una secuencia de nucleótidos en plástidos de planta, puede usarse el vector de transformación de plástido pPH143 (documento WO 97/32011, Ejemplo 36). La secuencia de nucleótidos se inserta en pPH143, sustituyendo así la secuencia codificante de PROTOX. Este vector se usa entonces para la transformación de plástidos y la selección de transformantes para resistencia a espectinomicina. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos se inserta en pPH143 de manera que sustituya al gen *aadH*. En este caso, se seleccionan transformantes para resistencia a inhibidores de PROTOX.

55 Técnicas de transformación para dicotiledóneas son muy conocidas en la técnica e incluyen técnicas basadas en *Agrobacterium* y técnicas que no requieren *Agrobacterium*. Las técnicas mediadas no por *Agrobacterium* implican la captación de material genético exógeno directamente por protoplastos o células. Esto puede llevarse a cabo por PEG o captación mediada por electroporación, administración mediada por bombardeo de partículas o

microinyección. Ejemplos de estas técnicas se describen por Paszkowski et al., EMBO J. 3: 2717-2722 (1984), Potrykus et al., Mol. Gen. Genet. 199: 169-177 (1985), Reich et al., Biotechnology 4: 1001-1004 (1986), y Klein et al., Nature 327: 70-73 (1987). En cada caso, las células transformadas se regeneran dando plantas enteras usando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

- 5 La transformación mediada por *Agrobacterium* es una técnica preferida para la transformación de dicotiledóneas debido a su alta eficiencia de transformación y su amplia utilidad con muchas especies diferentes. La transformación mediada por *Agrobacterium* normalmente implica la transferencia del vector binario que lleva el ADN extraño de interés (por ejemplo, pCIB200 o pCIB2001) a una cepa de *Agrobacterium* apropiada que puede depender del complemento de genes vir llevados por la cepa de *Agrobacterium* huésped tanto en un plásmido Ti co-residente como cromosómicamente (por ejemplo, cepa CIB542 para pCIB200 y pCIB2001 (Uknes et al. Plant Cell 5: 159-169 (1993)). La transferencia del vector binario recombinante a *Agrobacterium* se lleva a cabo por un procedimiento de apareamiento triparental usando *E. coli* que lleva el vector binario recombinante, una cepa de *E. coli* colaboradora que lleva un plásmido tal como pRK2013 y que es capaz de movilizar el vector binario recombinante a la cepa de *Agrobacterium* diana. Alternativamente, el vector binario recombinante puede transferirse a *Agrobacterium* por transformación de ADN (Hofgen & Willmitzer, Nucl. Acids Res. 16: 9877 (1988)).

La transformación de las especies de planta diana por *Agrobacterias* recombinantes normalmente implica el cultivo de las *Agrobacterias* con explantes de la planta y sigue protocolos muy conocidos en la técnica. El tejido transformado se regenera sobre medio de selección que lleva el marcador de resistencia a antibiótico o herbicida presente entre las fronteras de T-ADN de plásmido binario.

- 20 Otro enfoque para transformar células vegetales con un gen implica impulsar partículas inertes o biológicamente activas en tejidos de planta y células. Esta técnica se desvela en las patentes de EE.UU. N.º 4.945.050, 5.036.006 y 5.100.792, todas a Sanford et al. Generalmente, este procedimiento implica impulsar partículas inertes o biológicamente activas a las células en condiciones eficaces para penetrar en la superficie externa de la célula y proporcionar la incorporación dentro del interior de la misma. Cuando se utilizan partículas inertes, el vector puede introducirse en la célula recubriendo las partículas con el vector que contiene el gen deseado. Alternativamente, la célula diana puede estar rodeada por el vector de manera que el vector sea llevado en la célula por la estela de la partícula. Partículas biológicamente activas (por ejemplo, se busca introducir células de levadura secadas, bacteria secada o un bacteriófago, conteniendo cada uno ADN) también puede ser impulsadas en tejido de célula de planta.

- 30 La transformación de la mayoría de las especies monocotiledóneas también se ha convertido ahora en rutinaria. Técnicas preferidas incluyen transferencia génica directa en protoplastos usando PEG o técnicas de electroporación, y bombardeo con partículas en tejido de callo. Las transformaciones pueden ser realizadas con una única especie de ADN o múltiples especies de ADN (es decir, co-transformación). La co-transformación puede tener la ventaja de evitar la construcción de vectores completos y de generar plantas transgénicas con loci sin unir para el gen de interés y el marcador de selección, permitiendo la eliminación del marcador de selección en generaciones posteriores, en caso de que esto se considere deseable. Sin embargo, una desventaja del uso de co-transformación es la frecuencia inferior al 100 % con la que especies de ADN separadas se integran en el genoma (Schocher et al. Biotechnology 4: 1093-1096 (1986)).

- 40 Las solicitudes de patente EP 0 292 435, EP 0 392 225, y el documento WO 93/07278, describen técnicas para la preparación de callo y protoplastos a partir de una línea endogámica de élite de maíz, transformación de protoplastos usando PEG o electroporación, y la regeneración de plantas de maíz a partir de protoplastos transformados. Gordon-Kamm et al. (Plant Cell 2: 603-618 (1990)) y Fromm et al. (Biotechnology 8: 833-839 (1990)) han publicado técnicas para la transformación de la línea de maíz derivada de A188 usando bombardeo de partículas. Además, el documento WO 93/07278 y Koziel et al. (Biotechnology 11: 194-200 (1993)) describe técnicas para la transformación de líneas endogámicas de élite de maíz por bombardeo de partículas. Esta técnica utiliza embriones de maíz inmaduros de 1,5-2,5 mm de longitud cortados de una mazorca de maíz 14-15 días después de la polinización y un dispositivo PDS -1000He Biolistics para el bombardeo.

- 50 La transformación de arroz también puede realizarse por técnicas de transferencia génica directa utilizando protoplastos o bombardeo de partículas. La transformación mediada por protoplastos se ha descrito para tipos Japonica y tipos Indica (Zhang et al. Plant Cell Rep 7: 379-384 (1988); Shimamoto et al. Nature 338: 274-277 (1989); Datta et al. Biotechnology 8: 736-740 (1990)). Ambos tipos también son rutinariamente transformables usando bombardeo de partículas (Christou et al. Biotechnology 9: 957-962 (1991)). Además, el documento WO 93/21335 describe técnicas para la transformación de arroz mediante electroporación.

- 55 La solicitud de patente EP 0 332 581 describe técnicas para la generación, transformación y regeneración de protoplastos de Poideae. Estas técnicas permiten la transformación de Dactilis y trigo. Además, la transformación de trigo se ha descrito por Vasil et al. (Biotechnology 10: 667-674 (1992)) usando bombardeo con partículas en células de callo regenerable a largo plazo de tipo C, y también por Vasil et al. (Biotechnology 11:1553-1558 (1993)) y Weeks et al. (Plant Physiol. 102: 1077-1084 (1993)) usando bombardeo con partículas de embriones inmaduros y callo derivado de embrión inmaduro. Una técnica preferida para la transformación de trigo, sin embargo, implica la transformación de trigo por bombardeo con partículas de embriones inmaduros e incluye tanto una etapa de alta sacarosa como de alta maltosa antes de la administración génica. Antes del bombardeo, se siembra cualquier

- 60

número de embriones (0,75-1 mm de longitud) sobre medio MS con 3 % de sacarosa (Murashiga & Skoog, *Physiologia Plantarum* 15: 473-497 (1962)) y 3 mg/l de 2,4-D para la inducción de embriones somáticos, que se deja avanzar en la oscuridad. En día elegido del bombardeo, los embriones se sacan del medio de inducción y se disponen sobre el agente osmótico (es decir, medio de inducción con sacarosa o maltosa añadida a la concentración deseada, normalmente 15 %). Se deja que los embriones plasmolisen durante 2-3 horas y luego se bombardean. Veinte embriones por placa diana es típico, aunque no crítico. Un plásmido que lleva gen apropiado (tal como pCIB3064 o pSOG35) se precipita sobre partículas de oro de tamaño micrométrico usando procedimientos convencionales. Cada placa de embriones se dispara con el dispositivo de helio BIOLISTICS® de DuPont usando una presión de explosión de aproximadamente 1000 psi usando un tamiz de malla 80 estándar. Después del bombardeo, los embriones se ponen de nuevo en la oscuridad para recuperarse durante aproximadamente 24 horas (todavía en medio osmótico). Después de 24 h, los embriones se sacan del medio osmótico y se ponen de nuevo sobre el medio de inducción donde permanecen durante aproximadamente un mes antes de la regeneración. Aproximadamente un mes después los explantes de embrión con callo embriogénico en desarrollo se transfieren a medio de regeneración (MS + 1 mg/litro de NAA, 5 mg/litro de GA), que contienen además el agente de selección apropiado (10 mg/l es suficiente en el caso de pCIB3064 y 2 mg/l de metotrexato en el caso de pSOG35). Después de aproximadamente un mes, los brotes desarrollados se transfieren a recipientes estériles más grandes conocidos como "GA7s" que contienen MS a la mitad de concentración, 2 % de sacarosa, y la misma concentración del agente de selección.

También se ha descrito la transformación de monocotiledóneas usando *Agrobacterium*. Véase el documento WO 94/00977 y la patente de EE.UU. N.º 5.591.61 6. Véase, por tanto, Negrotto et al., *Plant Cell Reports* 19: 798-803 (2000).

Por ejemplo, puede usarse arroz (*Oryza sativa*) para generar plantas transgénicas. Pueden usarse diversos cultivares de arroz (Hiei et al., 1994, *Plant Journal* 6:271-282; Dong et al., 1996, *Molecular Breeding* 2:267-276; Hiei et al., 1997, *Plant Molecular Biology*, 35:205-218). Por tanto, los diversos constituyentes del medio descritos a continuación pueden ser tanto variados en cantidad como sustituidos. Se inician respuestas embriogénicas y/o se establecen cultivos de embriones maduros cultivando en medio MS-CIM (sales basales de MS, 4,3 g/litro; vitaminas B5 (200X), 5 ml/litro; sacarosa, 30 g/litro; prolina, 500 mg/litro; glutamina, 500 mg/litro; hidrolizado de caseína, 300 mg/litro; 2,4-D (1 mg/ml), 2 ml/litro; ajustar el pH a 5,8 con KOH 1 N; Phytigel, 3 g/litro). Tanto los embriones maduros en las etapas iniciales de cultivo como las líneas de cultivo establecidas se inoculan y se co-cultivan con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (*Agrobacterium*) que contiene la construcción de vector deseada. Se cultivan *Agrobacterias* a partir de disoluciones madre de glicerol sobre medio YPC sólido (100 mg/l de espectinomicina y cualquier otro antibiótico apropiado) durante aproximadamente dos días a 28 °C. Las *Agrobacterias* se resuspenden en medio MS-CIM líquido. El cultivo de *Agrobacterium* se diluye a una DO600 de 0,2-0,3 y se añade acetosiringona a una concentración final de 200 µM. La acetosiringona se añade antes de la mezcla de la disolución con los cultivos de arroz para inducir *Agrobacterias* para la transferencia de ADN a las células vegetales. Para la inoculación, los cultivos de planta se sumergen en la suspensión bacteriana. Se elimina la suspensión bacteriana líquida y los cultivos inoculados se colocan sobre medio de co-cultivo y se incuban a 22 °C durante dos días. Los cultivos se transfieren entonces a medio MS-CIM con ticarcilina (400 mg/litro) para inhibir el crecimiento de *Agrobacterias*. Para construcciones que utilizan el gen marcador de selección PMI (Reed et al., *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37:127-132), los cultivos se transfieren a medio de selección que contiene manosa como fuente de hidratos de carbono (MS con 2 % de manosa, 300 mg/litro de ticarcilina) después de 7 días, y se cultivan durante 3-4 semanas en la oscuridad. Entonces, se transfieren colonias resistentes a medio de inducción de regeneración (MS sin 2,4-D, 0,5 mg/litro de IAA, 1 mg/litro de zeatina, 200 mg/litro de timentina, 2 % de manosa y 3 % de sorbitol) y se cultivan en la oscuridad durante 14 días. Las colonias que proliferan se transfieren entonces a otra ronda de medio de inducción de regeneración y se mueven a la sala de crecimiento con luz. Los brotes regenerados se transfieren a recipientes de GA7 con medio GA7-1 (MS sin hormonas y 2 % de sorbitol) durante 2 semanas y entonces se mueven al invernadero cuando son lo suficientemente grandes y tienen raíces adecuadas. Las plantas se trasplantan a tierra en el invernadero (generación T₀), crecen hasta la madurez y se recoge la semilla T₁.

La plantas obtenidas mediante transformación con una secuencia de ácidos nucleicos pueden ser cualquiera de una amplia variedad de especies de planta, que incluyen aquellas de monocotiledóneas y dicotiledóneas; sin embargo, las plantas usadas en el método de la invención están seleccionadas preferentemente de la lista de cultivos diana agrónomicamente importantes expuesta arriba. La expresión de un gen en combinación con otras características importantes para la producción y calidad puede incorporarse en líneas de plantas mediante cultivo. Enfoques y técnicas de cultivo se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, Welsh J. R., *Fundamentals of Plant Genetics and Breeding*, John Wiley & Sons, NY (1981); Crop Breeding, Wood D. R. (Ed.) *American Society of Agronomy* Madison, Wis. (1983); Mayo O., *The Theory of Plant Breeding*, Segunda Edición, Clarendon Press, Oxford (1987); Singh, D. P., *Breeding for Resistance to Diseases and Insect Pests*, Springer-Verlag, NY (1986); y Wricke and Weber, *Quantitative Genetics and Selection Plant Breeding*, Walter de Gruyter and Co., Berlin (1986).

Para la transformación de pláستidos, se germinan semillas de *Nicotiana tabacum* c.v. "Xantienc" siete por placa en una matriz circular de 1" sobre medio T agar y se bombardean 12-14 días después de la siembra con partículas de tungsteno de 1 µm (M10, Biorad, Hercules, Calif.) recubiertas con ADN de pláستidos pPH143 y pPH145 esencialmente como se ha descrito (Svab, Z. y Maliga, P. (1993) *PNAS* 90, 913-917). Las plantas de semillero

bombardeadas se incuban en medio T durante dos días, después de lo cual las hojas se escinden y se colocan abaxiales boca arriba en luz brillante (350-500 μmol de fotones/ m^2/s) sobre placas de medio RMOP (Svab, Z., Hajdukiewicz, P. y Maliga, P. (1990) PNAS 87, 8526-8530) que contienen 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de diclorhidrato de espectinomicina (Sigma, St. Louis, Mo.). Se subclonan brotes resistentes que aparecen debajo de las hojas blanqueadas tres a ocho semanas después del bombardeo sobre el mismo medio selectivo, se deja que se forme callo, y se aíslan brotes secundarios y se subclonan. Se evalúa la segregación completa de copias de genoma de plástido transformado (homoplasmicidad) en subclones independientes por técnicas convencionales de transferencia Southern (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor). Se separa ADN celular total digerido con BamHI/EcoRI (Mettler, I. J. (1987) Plant Mol Biol Reporter 5, 346349) sobre geles de agarosa al 1 % de Tris-borato (TBE), se transfiere a membranas de nailon (Amersham) y se sonda con secuencias de ADN cebadas al azar marcadas con ^{32}P correspondientes a un fragmento de ADN BamHI/HindIII de 0,7 kb de pC8 que contiene una porción de la secuencia de direccionamiento de plástido rps 7/12. Se enraízan asépticamente brotes homoplásmicos sobre medio MS/IBA que contiene espectinomicina (McBride, K. E. et al. (1994) PNAS 91, 7301-7305) y se transfieren al invernadero.

Las propiedades genéticas se manipularon en las semillas transgénicas y las plantas descritas anteriormente se pasan por reproducción sexual o crecimiento vegetativo y pueden así mantenerse y propagarse en plantas de progenie. Generalmente, el mantenimiento y la propagación hacen uso de métodos agrícolas conocidos desarrollados para ajustarse a fines específicos tales como labra, siembra o recogida.

El uso de las ventajosas propiedades genéticas de las plantas transgénicas y semillas puede hacerse además en el cultivo de plantas. Dependiendo de las propiedades deseadas, se toman diferentes medidas de cultivo. Las técnicas relevantes son muy conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, hibridación, endogamia, cultivo por retrocruzamiento, cultivo multi-línea, mezcla de variedades, hibridación interespecífica, técnicas aneuploides, etc. Así, las semillas y plantas transgénicas pueden usarse para el cultivo de líneas de planta mejoradas que, por ejemplo, aumentan la eficacia de los métodos convencionales tales como tratamiento con herbicida o pesticida o permiten deshacerse de dichos métodos debido a sus propiedades genéticas modificadas.

Todas las publicaciones de patente y no de patente citadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de aquellos expertos en la materia a que la presente invención se refiere.

Ejemplos

El ADN recombinante estándar y las técnicas de clonación molecular usadas aquí son muy conocidas en la técnica y se describen por J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y por T. J. Silhavy, M. L. Berman, y L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1984) y por Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, pub. por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987).

La presente invención se describirá ahora a modo de varios ejemplos de trabajo. Estos ejemplos son para los fines de ilustración y no pretenden limitar la invención de ningún modo.

Ejemplo 1: Construcción de vectores binarios

Se construyeron un total de 29 construcciones binarias para probar diversos parámetros del método de ensayo transitorio y sus capacidades de creación de una correlación predictiva entre la expresión transitoria de un casete(s) de expresión y/o elemento(s) de expresión y cómo el (los) mismo(s) casete(s) de expresión y/o elemento(s) de expresión rendirán en líneas de plantas transgénicas estables. Véase la Tabla 1 para un resumen de los componentes del casete de expresión, además de un resumen experimental para cada construcción binaria.

Tabla 1: Sumario de casetes de expresión de vectores binarios

ID de construcción	Potenciadores transcripcionales	Promotor	Potenciadores traduccionales	CDS	Objetivos
18505		ZmPEPC		Gus	Para probar promotor de PEPC de <i>Zea mays</i> específico de hoja con y
18506	FMV+35S	ZmPEPC		Gus	
18507		ZmPEPC	TMV	Gus	sin potenciadores
18545	FMV+35S	ZmPEPC	TMV	Gus	
18216 (cont neg.)				Sin GUS	

ID de construcción	Potenciadores transcripcionales	Promotor	Potenciadores traduccionales	CDS	Objetivos
18508		ZmUbi361		Gus	Para probar promotor de ubiquitina-361 de <i>Zea mays</i> con y sin potenciadores
18509	FMV+35S	ZmUbi361		Gus	
18633		ZmUbi361	TMV	Gus	
17282	FMV+35S	ZmUbi361	TMV	Gus	
18503		CMP		Gus	Para probar promotor viral de CMP con y sin potenciadores
18504	FMV+35S	CMP	TMV	Gus	
17313	FMV+35S	ZmTrpA		Gus	Para probar promotor preferido de tallo
17319	FMV+35S	ZmTrpA	TMV	Gus	
18746		ZmUbi1-10		Gus	Para probar promotor de ubiquitina 1 de <i>Zea mays</i> con y sin secuencia de Kozak
18550		ZmUbi1-10		Gus	
18874	FMV+35S	ZmUbi1-04	TMV	Gus	
17084 (ER)		ZmPEPC		EG	Para probar integridad y función de proteína (endoglucanasa)
17085 (chl)		ZmPEPC		EG	
17086 (apo)		ZmPEPC		EG	
15944 (ER)		ZmPEPC		CBHI-ER	Para probar integridad y función de proteína (celulasa)
15942 (VSD)		ZmPEPC		CBHI-VSD	
17305 (mazorca)		OsMADs13		iARN-R1	Para probar regulación transitoria de un gen R1
17308 (hoja)		PepC		iARN-R1	
18286 (tallo)		TrpA		iARN-R1	
18221	FMV+35S	ZmUbi361	TMV	Xilanasas	Para probar las capacidades predictivas del ensayo transitorio con respecto a fenotipos negativos
18216	FMV+35S	ZmUbi361	TMV	CBHI	
17632	FMV+35S	ZmUbi361	TMV	EG	
15060		PepC y MTL		Cry1Ab	Para probar la eficacia de plantas que expresan transitoriamente un gen Cry1Ab

- La Tabla 1 explica resumidamente construcciones de expresión binarias usadas para tanto la generación de plantas transgénicas estables, además de para la expresión transitoria en tejidos de hoja de planta joven intactos. Las secuencias de ADN que codifican proteínas se optimizaron en los codones para el huésped apropiado. Por ejemplo,
- 5 las construcciones de expresión diseñadas para la expresión de plantas transgénicas transitoria y estable de tabaco y maíz se optimizaron en los codones para dicotiledóneas, mientras que las construcciones de expresión diseñadas para la expresión de plantas transgénicas transitoria y estable de caña de azúcar o maíz se optimizaron en los codones para monocotiledóneas. Están disponibles tablas de optimización de codones mediante aplicaciones de software comercial tales como Vector NTI 11.0 (Invitrogen, EE.UU.).
- 10 Se usaron técnicas de clonación estándar tales como PCR, digestión con enzimas de restricción, electroforesis en gel y purificación de fragmentos de subsecuencia, ligación de ADN, transformación y selección de células bacterianas, y similares, para generar los vectores descritos en la Tabla 1 (véase Sambrook 1985 para métodos

convencionales). Algunos de los componentes de los vectores de expresión descritos en la Tabla 1 se sintetizaron por un laboratorio de síntesis de ADN comercial (GeneArt, Alemania).

5 El vector binario 18505 contiene un casete de expresión con los siguientes componentes operativamente unidos juntos en este orden: el promotor de fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPC) de maíz (SEQ ID NO: 1); el gen de beta-glucuronidasa (GUS) (SEQ ID NO: 14); y la secuencia de terminación de PEPC de maíz (SEQ ID NO: 21). 18506 es el mismo que 18505, excepto que dos potenciadores transcripcionales, la región de potenciador del virus del mosaico de la escrofularia (FMV) (SEQ ID NO: 11) y la región de potenciador del virus del mosaico de la coliflor 35s (e35S) (SEQ ID NO: 12), están incluidos en la dirección 5' del promotor. 18507 es el mismo que 18505, excepto que se incluye un potenciador traduccional del tobamovirus del mosaico de tabaco omega (TMV) (SEQ ID NO: 13) en la dirección 5' del gen GUS. 18545 es el mismo que 18505, excepto que los dos potenciadores transcripcionales, FMV y e35S, están incluidos en la dirección 5' del promotor y el potenciador traduccional, TMV, se incluye en la dirección 5' del gen GUS.

15 El vector binario 18508 contiene un casete de expresión con los siguientes componentes operativamente unidos juntos en este orden: el promotor de ubiquitina de 361 de maíz (ZmUbi361) (SEQ ID NO: 2); el gen GUS y la secuencia de terminación ZmUbi361 (SEQ ID NO: 22). 18509 es el mismo que 18508, excepto que dos potenciadores transcripcionales, FMV y e35S, están incluidos en la dirección 5' del promotor. 18633 es el mismo que 18505, excepto que TMV se incluye en la dirección 5' del gen GUS. 17282 es el mismo que 18633, excepto que los dos potenciadores transcripcionales, FMV y e35, están incluidos en la dirección 5' del promotor.

20 El vector binario 18503 contiene un casete de expresión con los siguientes componentes operativamente unidos juntos en este orden: el promotor del virus del rizado amarillo de Cestrum (CMP) (SEQ ID NO: 3); el gen GUS; y la secuencia de terminación de nopalina sintetasa (NOS) (SEQ ID NO: 23). 18504 es el mismo que 18503, excepto que dos potenciadores transcripcionales, FMV y e35S, están incluidos en la dirección 5' del promotor y el potenciador traduccional, TMV, se incluye en la dirección 5' del gen GUS.

25 El vector binario 17313 contiene un casete de expresión con los siguientes componentes operativamente unidos juntos en este orden: el promotor de la subunidad alfa de triptófano sintasa de maíz (ZmTrpA) (SEQ ID NO: 4); GUS y la secuencia de terminación ZmTrpA (SEQ ID NO: 24). 17319 es el mismo que 17313, excepto que los dos potenciadores transcripcionales, FMV y e35, están incluidos en la dirección 5' del promotor y el potenciador traduccional, TMV, se incluye en la dirección 5' del gen GUS.

30 El vector binario 18550 contiene un casete de expresión con los siguientes componentes operativamente unidos juntos en este orden: el promotor ZmUbi1-10 de maíz (SEQ ID NO: 5); el gen GUS y la secuencia de terminación de NOS. 18746 es el mismo que 18550, excepto que se ha eliminado la secuencia de Kozak de maíz (TAAACC) que generalmente precede al codón ATG del gen GUS. 18874 es el mismo que 18550, excepto que se usa el promotor prZmUbi1-4 de maíz (SEQ ID NO: 6) en lugar del promotor prZmUbi1-10 de maíz y los dos potenciadores transcripcionales, FMV y e35S, están incluidos en la dirección 5' del promotor y el potenciador traduccional, TMV, se incluye en la dirección 5' del gen GUS.

35 El vector binario 17084 contiene un casete de expresión con los siguientes componentes operativamente unidos juntos en este orden: el promotor ZmPEPC; una secuencia codificante de endoglucanasa (EG) (SEQ ID NO: 15) con una gamma-zeína, péptido señal de 19 aminoácidos en el extremo 5' y una secuencia de retención de ER (SEKDEL) en el extremo 3'; y la secuencia de terminación de PepC (SEQ ID NO: 25). 17085 es el mismo que 17084, excepto que el gen EG comprende una secuencia de direccionamiento de vacuolas de almacenamiento de proteínas de semilla. 17086 es el mismo que 17084, excepto que el gen EG, se dirige al apoplasto. 15944 es el mismo que 17084, excepto que se usa un gen de celobiohidrolasa I que comprende una secuencia de retención de ER (SEQ ID NO: 16) en lugar de EG. 15942 es el mismo que 17084, excepto que se usa un gen de celobiohidrolasa I que comprende una secuencia de direccionamiento de vacuolas (SEQ ID NO: 17) en lugar del gen EG.

40 El vector binario 17305 contiene un casete de expresión con los siguientes componentes operativamente unidos juntos en este orden: la región de promotor del gen de la caja MADs de arroz (OsMADs13) (SEQ ID NO: 7); un casete de iARN de agua dicinasa de glucano (R1) (SEQ ID NO: 18); y la secuencia de terminación OsMADS13 (SEQ ID NO: 25). El vector binario 17308 contiene un casete de expresión con los siguientes componentes operativamente unidos juntos en este orden: el promotor PepC de maíz; un casete de iARN de R1; y la secuencia de terminación de NOS. El vector binario 18286 contiene un casete de expresión con los siguientes componentes operativamente unidos juntos en este orden: el promotor TrpA de maíz; el casete de iARN de R1; y una secuencia de terminación de TrpA de maíz.

45 El vector binario 18221 contiene un casete de expresión con los siguientes componentes operativamente unidos juntos en este orden: dos potenciadores transcripcionales, FMV y e35S; el promotor ZmUbi361-01; el potenciador traduccional, TMV; un gen de xilanasa (SEQ ID NO: 19); y la secuencia de terminación ZmUbi361. 18216 es el mismo que 18221, excepto que se usa el gen EG en lugar del gen de xilanasa. 17632 es el mismo que 18221, excepto que se usa el gen dirigido de vacuolas CBHI en lugar del gen de xilanasa.

El vector binario 15060 contiene un casete de expresión con los siguientes componentes operativamente unidos juntos en este orden: el promotor PepC de maíz; un gen Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* (SEQ ID NO: 20); y una secuencia de terminación de NOS.

Ejemplo 2: Método de ensayo transitorio *in planta*

5 Se clonaron casetes de expresión en un vector binario como se describe en el Ejemplo 1. Las construcciones se transfirieron en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el plásmido colaborador (pSBI) usando un método de congelación-descongelación [An et al., Binary vector. En: Gelvin SB, Schilpoot RA (eds), Plant molecular biology manual. Kluwar Academic Publishers, Dordrecht, pp A3 1-19 (1988)]. La preparación de cultivos de *Agrobacterium* se llevó a cabo como se describe por Azhakanandam et al., Plant Mol. Biol. 63: 393-404 (2007).
10 En resumen, las Agrobacterias genéticamente modificadas se cultivaron durante la noche en 50 ml de medio YP que contenía acetosiringona 100 µM y MES 10 µM (pH 5,6), y posteriormente se sedimentaron por centrifugación a 4000Xg durante 10 min. Los sedimentos se resuspendieron en el medio de infección [sales de Murashige y Skoog con vitaminas, 2 % de sacarosa, MES 500 µM (pH 5,6), MgSO₄ 10 µM y acetosiringona 100 µM] a DO600 = 0,5 y posteriormente se mantuvieron a 28 grados C durante 2-3 horas.

15 Se estableció el sistema de expresión transitorio *in planta* usando plantas de semillero de maíz. Se germinaron semillas bajo condiciones de invernadero en macetas de 2,5" llenas de mezcla de germinación Fafard. Las plantas de semillero se mantuvieron bajo un ciclo de 14/10 días/noches con una intensidad de luz de día de 2000 µ-moles-m-2.s-1 mantenida con iluminación complementaria. La temperatura se mantuvo estacionaria entre 23 °C-26 °C. Se probó agroinfiltración en plantas de semillero en el estadio V1 a V3, y que tenían 2-6 hojas visibles (Ritchie S.W., Hanway J.J. Benson G.O. (edts): How a Corn Plant Develops: Iowa State Univ Special Report No. 48, julio de 2005). A partir de este trabajo se determinó que el estadio V-2 con 3 hojas visibles funcionó mejor para la agroinfiltración. El experimento de agroinfiltración se realizó principalmente usando hojas primarias y secundarias del estadio V2. Para hacer la infiltración más fácil, las plantas de semillero se regaron 1-2 horas antes de la agroinfiltración para mantener la hoja túrgida y los estomas abiertos. La infiltración de hojas individuales se llevó a cabo en plantas de semillero de maíz usando un cuerpo de jeringa de 5 ml (jeringa de 5 ml de BD con punta Luer-Lok™, BD, Franklin Lakes, NJ 07427, EE.UU.), presionando la punta de la jeringa contra la superficie abaxial de la hoja. La primera y segunda hojas visibles del estadio V2 se infiltraron con: 1 ml de suspensión de *Agrobacterium*/28 segundos/hoja. También se infiltraron plantas de semillero de sorgo y de arroz de la misma forma que para el maíz, excepto que las plantas de semillero de arroz tuvieron 45 días de edad. Se transfirieron las plantas infiltradas y se mantuvieron bajo condiciones de cámara de crecimiento establecidas a 25 °C con un ciclo de 16/8 días/noches con una intensidad de luz de 1900 µ-moles-m-2.s-1. El tejido de planta se recogió después de 3-7 días después de la infiltración para el análisis posterior.

Para garantizar que la medida de actividad enzimática era debida a la expresión en planta de las enzimas, las construcciones de expresión también incorporaron un intrón en la secuencia de polinucleótidos que codificaba la enzima. La presencia del intrón garantiza que la expresión de la enzima es debida a la expresión de planta (capaz de procesar fuera el intrón y, por tanto, expresar una enzima completamente procesada) frente a la expresión de *Agrobacterium* (incapaz de procesar el intrón y así no capaz de expresar una enzima/proteína funcional).
35

Ejemplo 3: Transformación de plantas estables

40 Con el fin de comparar la expresión transitoria con plantas transgénicas estables, cada construcción binaria como se describe en el Ejemplo 1 se transformó establemente en maíz. La transformación en maíz se llevó a cabo como se ha informado (Negrotto et al., 2000; Li et al., 2003; Ishida, 1996). Los eventos transgénicos se enviaron a invernadero para diversos análisis, tales como expresión de ADN, ARN y de proteínas, y para recoger semillas de transformantes primarios.

Ejemplo 4: Análisis transitorio del rendimiento de casetes de expresión y la posterior correlación con líneas transgénicas estables

45 Las Tablas 2-4 resumen los datos para tanto transformantes transitorios como estables que comprenden casetes de expresión que contienen diversos promotores junto con combinaciones de tanto potenciadores transcripcionales como traduccionales. Todas las muestras se analizaron para tinción de GUS por tanto ensayo histoquímico de GUS como ELISA cuantitativo de GUS. Se usaron ensayos histoquímicos de GUS para localizar dónde la proteína GUS está presente en el tejido de planta.
50

Se recogieron hojas de plantas transgénicas que contenían el gen GUS y también se infiltraron plantas con el gen GUS y se tificaron con tampón para GUS como se describe por Azhakanandam et al (2000). Se llevaron a cabo ELISA cuantitativos de GUS llevando a cabo una etapa de extracción usando muestras de hoja recogidas en tampón de extracción BB/PVP/Tw (borato 0,1 M, pH 7,5 que contiene 0,5 % de Tween-20 y 0,2 % de polivinilpirrolidona). Se extrajeron aproximadamente 50 mg de tejido de hoja con 0,5 ml de tampón de extracción. Se ensayaron los sobrenadantes. Se determinó la cantidad de proteína soluble total por el método de BCA (kit de ensayo de proteínas Pierce BCA, Cat N.º 23223 y 23224) usando ovoalbúmina como patrón. Se recubrieron placas de 96 pocillos de alta unión (Nunc Maxisorp) a 4 °C durante la noche con 2 µg/ml de IgG de conejo anti-GUS (Sigma G5545) en borato 25
55

mM, NaCl 75 mM, pH 8,5 (100 µl/pocillo). Las placas se lavaron tres veces con Tris 10 mM, pH 8,0 que contenía 0,05 % de Tween-20 y 0,2 % de NaN₃. Las muestras o patrones (GUS tipo VII-A, Sigma G7646) se añadieron a la placa (100 µl/pocillo), se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación y se lavaron cinco veces. Entonces se añadieron 100 µl/pocillo de 2 µg/ml de IgG de conejo anti-GUS marcada con HRP (Invitrogen A5790 conjugado con HRP) a la placa, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación, y se lavaron como antes. Se detectó el anticuerpo conjugado con HRP añadiendo 100 µl/pocillo de tetrametilbencidina (TMB, Sigma T0440) y desarrollando durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl/pocillo de HCl 0,1N. La absorbancia se midió a 450 nm con 620 como referencia usando un lector de microplacas (Tecan Sunrise, Research Triangle Park, NC). La curva patrón de GUS usa un ajuste a curva de 4 parámetros. La curva se representa lineal frente al log con un intervalo de 0 a 320 ng/ml.

Evaluación del promotor de PEPC

Se usaron experimentalmente las construcciones 18505, 18506, 18507 y 18545 para determinar si puede hacerse o no una correlación entre el rendimiento (con respecto a la expresión de GUS) de los casetes de expresión asociados en tejido de hoja de maíz transitoriamente transformado cuando se compara con tejido de hoja de maíz establemente transformado (Véase la Tabla 2). Para los ensayos transitorios, se usaron 4 plantas por construcción. Para cada planta, se agro-infiltraron dos hojas como se describe en el Ejemplo 2. Se recogieron tejidos de las hojas infiltradas y se ensayaron usando un ELISA cuantitativo como se describe previamente para medir la proteína GUS.

Tabla 2: Resumen de datos de tinción de GUS para tanto tejido de hoja de maíz transitorio como tejido de hoja de maíz transgénico estable que comprende el promotor PEPC y diversas combinaciones de elementos de expresión

ID de construcción (promotor, potenciadores)	Sistema transitorio de maíz <i>in planta</i>	Plantas transgénicas de maíz (TO)
	Promedio (GUS ng/mg de TSP)	Promedio (GUS ng/mg de TSP)
18505 (PEPC)	8,43	7366,25
18506 (PEPC + FMV + e35s)	30,89	15345,08
18507 (PEPC + TMV)	8,8	2861,18
18545 (PEPC + FMV + e35s + TMV)	20,48	6116,78
Evento nulo	NA	0
Medio infiltrado	0	N/A
No infiltrado	0	N/A

Según los datos en la Tabla 2, el sistema transitorio es predictivo de la expresión de proteínas en una base baja/media/alta para plantas transgénicas estables. La construcción 18506 que contiene el promotor PEPC en combinación con los potenciadores transcripcionales FMV y e35s rindió mejor en tanto muestras de maíz transgénico transitorias como estables. Sorprendentemente, se mostró en tanto transformantes transitorios como estables que TMV suprimió la expresión de GUS. Alternativamente, la combinación de FMV y e35s (no en combinación con TMV) aumentó significativamente la expresión de GUS en tanto transgénicos transitorios como estables.

Evaluación de promotores ZmUbi361

Se usaron experimentalmente las construcciones 18508, 18509, 18633 y 17282 para determinar si puede hacerse o no una correlación entre el rendimiento (con respecto a la expresión de GUS) de los casetes de expresión asociados en tejido de hoja de maíz transitoriamente transformado cuando se compara con tejido de hoja de maíz establemente transformado (Véase la Tabla 3). Para los ensayos transitorios, se usaron 4 plantas por construcción. Para cada planta, se agro-infiltraron dos hojas como se describe en el Ejemplo 2. Se recogieron tejidos de las hojas infiltradas y se ensayaron usando un ELISA cuantitativo como se describe previamente para medir la proteína GUS.

Tabla 3: Resumen de datos de tinción de GUS para tanto tejido de hoja de maíz transitorio como tejido de hoja de maíz transgénico estable que comprende el promotor ZmUbi361 y diversas combinaciones de elementos de expresión

ID de construcciones (promotor, potenciador)	Sistema transitorio de maíz <i>in planta</i>	Plantas transgénicas de maíz (TO)
	Promedio (GUS ng/mg de TSP)	Promedio (GUS ng/mg de TSP)
18508 (Ubi361)	2,93	816,74
18509 (Ubi361, FMV y e35s)	96,8	105899,64
18633 (Ubi361, TMV)	6,99	1698,78
17282 (Ubi361, FMV, e35s y TMV)	11,56	31305,12
18216 (control negativo)	0	0
Evento nulo	0	0

- 5 Como se observa en la Tabla 3, los datos transitorios se correlacionan con datos generados en plantas transgénicas de maíz estables. Como se observa con el promotor PEPC, la combinación óptima con respecto a la expresión de GUS fue el promotor Ubi361 en combinación con tanto el potenciador de transcripción FMV como e35s en tanto grupos de prueba transgénicos transitorios como estables. La segunda expresión de GUS más alta fue la combinación que comprende el promotor Ubi361, los potenciadores transcripcionales FMV y e35s, y el potenciador traduccional TMV en tanto grupos de prueba transitorios como estables. Sorprendentemente, TMV pareció otra vez que suprimía la expresión de GUS como se observa en el experimento de PEPC (Tabla 2).

Evaluación del promotor CMP

- 15 Se usaron experimentalmente las construcciones 18503 y 18504 para determinar si puede hacerse o no una correlación entre el rendimiento (con respecto a la expresión de GUS) de los casetes de expresión asociados en tejido de hoja de maíz transitoriamente transformado cuando se compara con tejido de hoja de maíz establemente transformado (Véase la Tabla 4). Para los ensayos transitorios, se usaron 4 plantas por construcción. Para cada planta, se agro-infiltraron dos hojas como se describe en el Ejemplo 2. Se recogieron tejidos de las hojas infiltradas y se ensayaron usando un ELISA cuantitativo como se describe previamente para medir la proteína GUS.

- 20 Tabla 4: Resumen de datos de tinción de GUS para tanto tejido de hoja de maíz transitorio como tejido de hoja de maíz transgénico estable que comprende el promotor CMP y diversas combinaciones de elementos de expresión

ID de construcciones (promotor, potenciador)	Sistema transitorio de maíz <i>in planta</i>	Plantas transgénicas de maíz (TO)
	Promedio (GUS ng/mg de TSP)	Promedio (GUS ng/mg de TSP)
18503 (CMP)	8,13	523,06
18504 (CMP, FMV e35s y TMV)	6,7	217,4
18216 (control negativo)	0	NA
Evento nulo	NA	0
Medio infiltrado	0	N/A
No infiltrado	0	N/A

Como se observa en la Tabla 4, los datos transitorios fueron otra vez predictivos del mejor casete de expresión (18504) con respecto a la expresión de GUS para plantas de maíz transgénico estable.

- 25 En general, como se observa en las Tablas 2-4, el método de ensayo transitorio predijo satisfactoriamente (con respecto a los niveles de expresión de GUS) que los tres promotores en combinación con tanto los potenciadores transcripcionales FMV como e35s rendirían mejor en líneas de maíz transgénico estable. Esta misma capacidad predictiva del método de ensayo transitorio *in planta* también puede observarse en el análisis transitorio del promotor

preferido de tallo TRPA como se observa en la Tabla 5. El análisis transitorio puede llevarse a cabo durante el transcurso de aproximadamente una semana en comparación con el análisis de plantas de maíz T0 que duraría posiblemente meses hasta cultivar plantas y analizar. El método transitorio también fue capaz de identificar rápidamente (como se valida en transgénicos estables) que el potenciador traduccional TMV puede en muchos casos suprimir la expresión del gen (GUS) que es sorprendente debido a la supuesta función de región de potenciador TMV. Al menos en las muestras de prueba como se describe en las Tablas 2-4 anteriores, la presencia de TMV suprimió la expresión de GUS. Otra vez, esta observación puede predecirse por el uso de los métodos transitorios *in planta* como se enseñan en el presente documento. Otra observación predictiva de lo que se produjo en plantas transgénicas estables es el hecho que la combinación de tanto potenciadores transcripcionales FMV como e35s permite un aumento significativo en la expresión de GUS. Como se demuestra en las Tablas 2-4 anteriores, el método transitorio *in planta* puede predecir cuantitativa y rápidamente la mejor combinación de promotor/potenciador a llevar adelante en líneas de maíz transgénico estable. El método transitorio *in planta* haría ahorros significativos en tiempo, recursos, espacio de invernadero y gastos en la evaluación de los mejores casetes de expresión para la expresión de cualquier gen de interés dado.

15 Tabla 5: Resumen de datos de tinción de GUS para tanto tejido de hoja de maíz transitorio como tejido de hoja de maíz transgénico estable que comprende el promotor TrpA

ID de construcciones	Sistema transitorio de maíz <i>in planta</i>	Plantas transgénicas de maíz (T0)
	Promedio (GUS ng/mg de TSP)	Promedio (GUS ng/mg de TSP)
17313	3,3	73,6
17319	4,44	1612,8
18216 (control negativo)	0	0
Evento nulo	NA	0
Medio infiltrado	0	N/A
No infiltrado	0	N/A

Ejemplo 5: Análisis transitorio de la expresión cualitativa de proteínas asociadas al direccionamiento celular y posterior correlación con líneas transgénicas estables

20 Se llevó a cabo análisis de transferencia Western en tanto plantas transgénicas transitorias como estables que expresaban un gen de endoglucanasa. Como se observa en la Tabla 6, la endoglucanasa se dirigió al ER, el cloroplasto y el apoplasto. Se molieron aproximadamente 200 mg de tejido de hoja fresco de cada ID de planta dando un polvo fino usando un molinillo Kleco, entonces se extrajo en 1 ml de acetato de Na 100 mM, 0,02 % de Tween, 0,02 % azida de Na a pH 4,75, y comprimidos de mezcla de inhibidor de la proteasa completo (Roche). Se colocaron muestras en agitadores rotacionales de mesa durante 30-60 minutos y luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. La cantidad de proteína total extraída se midió por el protocolo de Pierce BCEI como se ha explicado resumidamente en la bibliografía de producto. Tras la extracción de endoglucanasa, se llevó a cabo análisis de transferencia Western usando el protocolo estándar. La proteína EG se detectó por transferencia Western por sonda de anticuerpo anti-EG.

30 Tabla 6: Análisis de transferencia Western de plantas de maíz transgénicas transitorias y estables que expresan un gen de endoglucanasa heterólogo dirigido a diversos orgánulos subcelulares

ID de construcciones	Direccionamiento subcelular	ID de planta	Tamaño de proteína*	
			Sistema transitorio	Planta transgénica estable
17084	ER	1	superior al esperado	superior al esperado
		2	superior al esperado	superior al esperado
		3	superior al esperado	superior al esperado
		4	superior al esperado	superior al esperado
		5	superior al esperado	superior al esperado
		6	superior al esperado	NA

ID de construcciones	Direccionamiento subcelular	ID de planta	Tamaño de proteína*	
			Sistema transitorio	Planta transgénica estable
17085	Cloroplasto	1	esperado	Esperado
		2	esperado	Esperado
		3	esperado	Esperado
		4	esperado	Esperado
		5	esperado	Esperado
		6	esperado	NA
17086	Apoplastos	1	superior al esperado	superior al esperado
		2	superior al esperado	superior al esperado
		3	superior al esperado	superior al esperado
Control de medio infiltrado		1	Ninguno	
Control no infiltrado		1		

Como se observa en la Tabla 6, el método de ensayo transitorio fue capaz de predecir que el direccionamiento de una endoglucanasa en tanto el ER como el apoplasto produciría una endoglucanasa que tiene una proteína mayor en tamaño que la esperada según el análisis de transferencia Western en tanto líneas de maíz transgénico transitorias como estables. Esto pueden ser debido a, por ejemplo, glucosilación de la proteína. Alternativamente, el ensayo transitorio predijo satisfactoriamente que el direccionamiento de una endoglucanasa al cloroplasto produciría un tamaño de proteína esperado como se indica por el análisis de transferencia Western en líneas de maíz transgénico estable. En general, el método de ensayo *in planta* fue capaz de predecir los menores medios para expresar una proteína en planta basada en datos cualitativos (es decir, análisis de transferencia Western). También se prevé que la escisión de proteína pudiera predecirse del mismo modo usando los métodos transitorios *in planta* descritos en el presente documento.

Adicionalmente, como se muestra en la Tabla 7, la actividad de endoglucanasa puede medirse en transformantes transitorios. Para el ensayo de actividad enzimática, se molieron aproximadamente 200 mg de tejido de hoja fresca de una planta transgénica dando un polvo fino usando un molinillo Kleco, entonces se extrajo en 1 ml de acetato de Na 100 mM, 0,02 % de Tween, 0,02 % azida de Na a pH 4,75, y comprimidos de mezcla de inhibidor de la proteasa completo (Roche). Se colocaron muestras en agitadores rotacionales de mesa durante 30-60 minutos y luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. La cantidad de proteína total extraída se midió por el protocolo de Pierce BCEI como se ha explicado resumidamente en la bibliografía de producto. El ensayo de actividad de EG se llevó a cabo usando sustrato de carboximetil-celulosa (Megazyme). Todas las muestras se ensayaron por triplicado. Tras la extracción, se incubaron 20 ul de muestra con 245 ug de sustrato CMC-4M durante 120 minutos a 40 deg. El momento de tiempo cero se procesó inmediatamente. Después de la incubación, se midió la liberación de glucosa usando el kit de ensayo GOPOD (Megazyme). La actividad enzimática se detectó como la hidrólisis del sustrato de celulosa a glucosa. El ensayo de GOPOD se realizó combinando 20 ul de reacción de muestra, o patrones de glucosa de concentraciones conocidas, con 200 ul del reactivo GlucoseOx (Megazyme) en una placa de ensayo de 96 pocillos (Costar 3370) y se incubaron durante 20 minutos a 37 grados C. La absorbancia a la longitud de onda de 510 nm se midió usando el lector de placas SpectraMax 384 Plus. Los valores de absorbancia de reacciones de muestra se convirtieron en concentración de glucosa usando la ecuación de una curva patrón de glucosa generada representando el valor de absorbancia frente a la concentración estándar de glucosa conocida. La actividad enzimática se registra como umol de glucosa/minuto/g de tejido.

Tabla 7: Mediciones de actividad enzimática de endoglucanasa a partir de tejido de hoja transitorio

ID de construcción	ID de planta	Promedio de umol/min/mg de TSP	Desv estándar
18216 (Ubi-EG)	1	0,28	0,01
	2	0,35	0,03
	3	0,37	0,08

ID de construcción	ID de planta	Promedio de umol/min/mg de TSP	Desv estándar
	4	0,3	0,03
17282 (vector control)	6	0,07	0,01
LBA4404 (control de agro)	7	0,12	0,05

Ejemplo 6: Análisis transitorio rápido de la regulación por disminución de un gen R1 de maíz

5 Construcciones binarias 17305, 17308 y 18286 comprenden casetes de expresión que comprenden una iARN para el gen de degradación de almidón endógeno de maíz agua dicinasa de glucano (R1). Como se muestra en la Tabla 8, el tejido de hoja transformado transitorio puede usarse para predecir si una iARN particular puede de hecho regular por disminución o no un gen endógeno particular, en este caso R1 de maíz. Los niveles de ARNm de R1 se analizaron para el tejido de hoja joven de maíz transitoriamente transformado por qRT-PCR. Para realizar este análisis, se extrajo ARN de las muestras de hoja, seguido de digestión de ADN. Se seleccionaron ensayos TaqMan basados en la diana de interés que consiste en un cebador directo e inverso y una sonda marcada con FAM que fueron específicos para la secuencia diana. También se emplea una especie específica, diana de referencia marcada con TET, para cada muestra para el cálculo de expresión relativa. Se establecen reacciones de RT-PCR de una etapa por triplicado (3 para el gen de referencia endógeno, 3 para el gen diana) en placas de PCR de 384 pocillos. En cada placa se incluyen un control no mutante y control negativo no de RT para probar para amplificación no específica y contaminación de ADN, respectivamente. Los resultados se capturan en un ciclador térmico de tiempo real, los valores umbral se establecen por el analizador para cada indicador y se informan los datos resultantes. Se calcula la expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde $\Delta\Delta Ct = \text{diana} - \text{referencia}$) para cada muestra. Como se observa en la Tabla 8, todas las construcciones de iARN fueron satisfactorias en la regulación por disminución de R1 cuando se comparó con tejido no mutante (no infiltrado). El método *in planta* fue sorprendentemente capaz de verificar rápidamente que cada casete de iARN es funcional con respecto a la regulación por disminución del gen R1. La construcción 17305 contiene un promotor OSMADs13 que es un promotor específico de mazorca de maíz como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 2007/0006344A1. Es sorprendente que el ensayo *in planta* transitorio fuera capaz de llegar a la conclusión de que la iARN detrás de un promotor de OSMADs13 regula por disminución el gen R1 en hoja. Esto indica que el ensayo *in planta* puede ser capaz de evaluar no solo promotores que son activos en la hoja, sino también promotores que son promotores no de hoja tales como, por ejemplo, los promotores específicos de semilla, promotores específicos de mazorca o promotores específicos de raíz.

Tabla 8: Evaluación transitoria de la regulación por disminución de un gen R1 de maíz

ID de construcción-ID de planta	Nivel de transcritos de ARNm del gen R1
17305-1	313,24
17305-2	312,82
17305-3	277,89
17305-4	266,42
17305-5	405,33
17305-6	311,46
17308-1	272,63
17308-2	203,89
17308-3	290,11
17308-4	271,68
17308-5	256,96
17308-6	268,37
18286-1	464,96
18286-2	381,51

ID de construcción-ID de planta	Nivel de transcritos de ARNm del gen R1
18286-3	258,22
18286-4	203,87
18286-5	256,57
18286-6	260,63
No mutante (no infiltrado)	540,74

Ejemplo 7: Uso del método transitorio *in planta* para predecir los fenotipos de planta negativos y/o toxicidad asociados a la expresión de un gen heterólogo

5 La construcción 18221 comprende una xilanasa constitutivamente expresada por Ubi361. Como se muestra en la Tabla 9, la observación de tejido de maíz transitorio transformado con la construcción binaria 18221 produjo muerte celular obvia. Específicamente, aparecieron grandes círculos de tejido de hojas muertas sobre la hoja intacta transformada algunos días después de la infiltración transitoria del casete de xilanasa. Esto indica que el gen puede tener un efecto tóxico para la célula de planta. Cuando este mismo gen se expresa en semilla de maíz, se sabe (datos no mostrados) que la semilla tendrá un fenotipo arrugado con bajas velocidades de germinación. Estos datos indican que el ensayo transitorio *in planta* puede ser una herramienta útil en la evaluación previa de candidatos a gen con respecto a los problemas de toxicidad y/o de fenotipo negativo en transgénicos estables.

Tabla 9: Predicción de un fenotipo negativo asociado a la expresión de un gen heterólogo

ID de construcción	ID de planta	Fenotipo
		(muerte celular)
18221 (transitorio de maíz)	1	++++
	2	+++
	3	++++
Xyn-6002-apo para semilla de maíz	Evento 1 *	++++
17282 (control negativo)	1	-
	2	-
Maíz no infiltrado	1	-

"++++" : Indica que se observó un fenotipo

"-" : Indica que no se observó fenotipo

Ejemplo 8: Uso del método transitorio *in planta* para predecir la eficacia de proteína

15 La construcción 15060 comprende un casete de expresión que contiene un gen Cry1Ab que se sabe que es eficaz en controlar diversas plagas de lepidópteros cuando se expresa en cultivos transgénicos como se describe en la patente de EE.UU. 6.075.185. Se llevaron a cabo bioensayos de insecto usando el barrenador europeo del maíz (ECB) usando extracto de planta que contiene Cry1Ab a partir de tejido liofilizado de planta transitoriamente transformado con el gen Cry1Ab. Como se muestra en la Tabla 10, la eficacia de Cry1Ab transitoriamente expresado puede confirmarse al 93,75 % de mortalidad de ECB tras 7 días de ensayo en comparación con control (vectores vacíos) que mostraron poca o ninguna mortalidad.

Tabla 10: Evaluación transitoria *in planta* de un gen Cry1Ab

Placa N.º 1		Lectura 7 días			
Construcción	N.º de pocillos	Insecto	Larvas vivas	Larvas muertas	Mortalidad (%)
15060 (Cry1AB)	8	ECB	1	15	93,75 %
LBA4404	4	ECB	7	1	12,50 %
AX5707	4	ECB	8	0	0,00 %
0,2 % de Bactoagar	8	ECB	16	0	0,00 %

Ejemplo 8: Uso del método transitorio *in planta* para predecir perfiles metabólicos

5 Se realizó la expresión transitoria de enzimas en hojas de maíz usando el vector binario pEB47 que comprende una
 10 secuencia de polinucleótidos optimizada de monocotiledónea que codifica una sacarosa isomerasa (SEQ ID NO:
 26). El vector binario pEB47 contiene un casete de expresión con los siguientes componentes operativamente
 unidos juntos en este orden: un potenciador FMV; un potenciador 35S; un promotor de ubiquitina de maíz; una
 secuencia de direccionamiento de ER de gamma-zeína de maíz que dirige el polipéptido de sacarosa isomerasa al
 ER; una secuencia de direccionamiento vacuolar de esporamina que dirige el polipéptido de sacarosa isomerasa del
 ER a la vacuola; una secuencia de polinucleótidos optimizada de maíz que codifica una sacarosa isomerasa; un
 terminador NOS.

15 Se recogieron hojas de maíz y se analizaron para la presencia de isomaltulosa y trehalulosa (productos de actividad
 de sacarosa isomerasa dentro de la hoja de maíz). La secuencia de aminoácidos para una sacarosa isomerasa
 expresada por *Erwinia carotovora* se ha enumerado en GeneBank bajo el número de acceso YP049947. La actividad
 20 enzimática de sacarosa isomerasa se ensayó combinando la enzima con el sustrato, sacarosa, y midiendo la
 producción de isomaltulosa y trehalulosa. Se ensayó el extracto de proteína soluble total de la *E. coli* recombinante
 para la actividad de sacarosa isomerasa incubando 10 microlitros de lisado de *E. coli* de sobrenadante, como se ha
 descrito anteriormente, con 90 microlitros de sacarosa 292 mM-tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 6,0) a 30 grados
 C durante 20 horas. El producto de reacción se cribó para la presencia de isomaltulosa y trehalulosa por
 25 cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se realizó CCF aplicando 3
 microlitros de los sobrenadantes de los medios de crecimiento sobre placas de gel de sílice AL SIL G (Whatman) y
 se desarrollaron dos veces en un disolvente que consistía en 3 partes de acetato de etilo : 3 partes de ácido acético :
 1 parte de agua destilada. Después de secar, las placas se pulverizaron con una mezcla de colorante que consistía
 30 en 4 mililitros de anilina, 4 g de difenilamina, 200 mililitros de acetona y 30 mililitros de ácido fosfórico al 80 %. La
 isomaltulosa y la trehalulosa se distinguieron de otros azúcares, tales como sacarosa, por su movilidad relativa y por
 los distintos colores producidos cuando reaccionaron con colorante de anilina. Amarillo verdoso indica la presencia
 de isomaltulosa, rojo indica la presencia de trehalulosa y marrón/negro indica la presencia de sacarosa. Los
 monosacáridos, glucosa y fructosa, producidos mediante hidrólisis de sacarosa, fueron azules o rojo-naranja,
 respectivamente.

35 La identificación de los azúcares presentes en cada carril de la placa de CCF desarrollada fue posible comparando
 tanto la movilidad relativa de los azúcares presentes en las muestras como el color de tinción con colorante de
 anilina con respecto a la movilidad relativa y el color de tinción de patrones de azúcar. El producto de reacción de
 sacarosa isomerasa incubado con sacarosa como se ha descrito anteriormente fue tres bandas de color. La banda
 de movilidad más alta tuvo un color púrpura y migró con la misma movilidad que tanto los patrones de glucosa como
 40 de fructosa, de color azul y rojo, respectivamente, y, por tanto, se interpreta que es una mezcla de glucosa y fructosa
 co-migrante liberada mediante hidrólisis de uno de los disacáridos: sacarosa, isomaltulosa o trehalulosa. La banda
 central se correspondió con el patrón de isomaltulosa en tanto la coloración como la movilidad relativa y, por tanto,
 se identificó como isomaltulosa. La banda de migración más lenta tuvo una coloración roja y migró más lenta que
 cualquiera de la isomaltulosa, o patrones de sacarosa. La movilidad relativa de esta banda de azúcar se
 45 corresponde bien con los informes publicados sobre la migración de trehalulosa en ensayos de CCF similares (Cho
 et al. Biotechnology Letters (2007) 29:453-458; un microorganismo productor de isomaltulosa aislado de comida
 coreana tradicional). Por tanto, se concluyó que esta banda de azúcar era trehalulosa. No estuvo disponible patrón
 de trehalulosa en el momento del ensayo de CCF, sin embargo, análisis de HPLC posteriores (Dionex) de productos
 de reacción de sacarosa isomerasa y patrones obtenidos después indican que esta banda fue definitivamente
 50 trehalulosa. Por tanto, es importante mencionar que el producto de reacción 6 no contuvo ninguna sacarosa que
 tuviera una movilidad relativa más alta que la isomaltulosa y trehalulosa y movilidad más lenta que los
 monosacáridos glucosa y fructosa. La ausencia de sacarosa era de esperar debido a la conversión completa de
 sacarosa en isomaltulosa y trehalulosa debido a la actividad de la enzima sacarosa isomerasa. Alternativamente, se
 cribaron sobrenadantes por HPCL usando NaOH 16 mM para separar productos de reacción de sacarosa
 isomerasa, seguido de un gradiente lineal de 10 a 40 min usando NaOH 200 mM a 1 ml/min en un sistema Dionex
 DX-600 con detector electroquímico ED50 (Dionex Co.).

La Tabla 12 explica resumidamente datos que demuestran que la sacarosa isomerasa se expresa activamente en hojas de maíz que expresan transitoriamente sacarosa isomerasa y conducen a la acumulación de los azúcares, isomaltulosa y trehalulosa, dentro de la hoja de maíz. Los datos indican que el método de ensayo transitorio *in planta* puede usarse para hacer perfiles metabólicos tales como, por ejemplo, perfiles de azúcar.

5 Tabla 12: Análisis de hidratos de carbono (HPAEC) de hojas de maíz que expresan transitoriamente sacarosa isomerasa (SEQ ID NO: 24).

Muestra	Glucosa + fructosa (% de azúcar total)	Sacarosa (% de azúcar total)	Trehalulosa (% de azúcar total)	Isomaltulosa (% de azúcar total)
47-6 (pEB47)	78,9	17,2	2,4	1,5
47-7 (pEB47)	63,7	33,3	2,1	0,9
47-8 (pEB47)	73,1	16,0	7,3	3,6
Control negativo (construcción que contiene GUS)	69,4	30,6	0,0	0,0
Tejido de hoja de control negativo	58,2	41,8	0,0	0,0

Ejemplo 9: Uso del método transitorio *in planta* en diversas plantas

10 Puede usarse el método *in planta* transitorio en diversas plantas como se muestra en los ejemplos previos (maíz) y en la Tabla 13 (sorgo) y Tabla 14 (arroz). AmCyan es un gen indicador fluorescente que puede analizarse por métodos muy conocidos en la técnica. Se analizaron líneas transitorias de arroz usando métodos de tinción de GUS.

Tabla 13: Expresión transitoria del gen AmCyan en sorgo

Genotipo de sorgo	ID de construcciones	AmCyan transitorio
		Promedio (ng/mg de TSP)
Brandes	13601	14,59
Della	13601	20,75
Dale	13601	21,37
Brandes (control negativo)	LBA4404	0
Della (control negativo)	LBA4404	0
Dale (control negativo)	LBA4404	0
No infiltrado	No infiltrado	0

Tabla 14: Expresión transitoria del gen GUS en arroz (c.v. Nipponbare)

ID de construcciones	GUS transitorio
	Promedio (ng/mg de TSP)
17282	20,6
18545	9,01
18216 (control negativo)	7,24

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Syngenta Biotechnology INC. Azhakanandam, Kasi

<120> UN MÉTODO PARA LA EXPRESIÓN TRANSITORIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN PLANTAS

5

<130> 72516

<160> 26

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2778

<212> ADN

15

<213> Zea mays

<220>

<221> promotor

<222> (1)..(2778)

20

<400> 1

ES 2 624 276 T3

tagaggcaac ccaagatagg tgaaagataa gcttcctttg tcacaattga atattcgtgc	60
aagggtggtcc aactattatt ttgagatggt tattgagacc attgaggacc tttgagtaat	120
taactctcaa cctagtagaa attcgttacc aactggggtg cataggattt catgattaac	180
agtgtgtttg gtttagctgt gagttttctc ctatgaaaag actgttgtga gaacaaaaag	240
ttgaaaatcg tttagttcaa actgttgtga gttatccact gtaaacaat tgtatattgt	300
ttatatacac tatgtttaac tatactctct aatcaatata tacaattaa aaactaaatt	360
cacatttgtg ttctaatat tttttacaaa taaatcattg ttcgattcca tttgtaatat	420
tttttattaa aattgttttt atttcattta ttataaacac ttaattgttt taatcctatt	480
ttagtttcaa tttattgtat ctatttatta atataacgaa cttcgataag aaacaaaagc	540
aaggccaagg tgttttttca gggctagttt gggagtccea aaattggagg gggtagagg	600
ggctaaaatc tcattcttat tcaaaattga ataaggaggg gatttttagcc cctctaatca	660
tcttcagttt tgtggctccc aaactagccc tcaaagtaga tgtggaaaag ttgaaccct	720
tttattcagc ttctagaagc aggtttgaaa aatagaacca aacaaaccct aaaagtgtgt	780
gaatttttaa caggtaatgg caggtaatt attcacatct ctttggcat gtttaagagg	840
ctgaaaatag atcaattgca agaacaaata gcagagtgga taggggtggg gaggggtcgt	900
ctccctatct gacctctctc ctgcattgga ttgcctttct cgtactcta tttaaaagta	960
caaatgaggt gccggattga tggagtgata tataagtttg atgtgttttt cacatacgtg	1020
acaagtatta ttgaaagaga acagttgcat tgetactggt tggatatggg aaaactgaga	1080
attgtatcat gcgatggccg atcagttctt tacttagctc gatgtaatta atgcacaatg	1140
ttgatagtat gtcgaggatc tagagatgta atgggtgtag gacacgtggt tagctactaa	1200
tataaatgta aggtcaaaat tcgatggttt attttctatt ttcaattacc tagcattatc	1260

ES 2 624 276 T3

tcattttctaa ttgtgtgata acaaatgcat tagaccataa ttctgtaaat acgtacattt 1320
aagcacacag tctatatttt aaaattcttc tttttgtgtg gatatcccaa cccaaatcca 1380
cctctctcct caatccgtgt atcttcaccg ctgccaaagt ccaacaacac atcgcatcgt 1440
gcaaatcttt gttggtttgt gcacggtcgg cgccaatgga ggagacacct gtacggtgcc 1500
cttggtagaa caacatcctt atccctatat gtatggtgcc tttcgtagaa tggcaccctt 1560
tatccctaca atagccatgt atgcatacca agaattaaat atactttttc ttgaaccaca 1620
ataatattt atagcggcac ttcttgttct gtttgaacac ttatttggaa caataaaatc 1680
ccgagttcct aaccacaggt tcactttttt tccttatcct cctaggaaac taaattttta 1740
attcataaat ttaattgaaa tgtaaatgaa aacaaaaaaaa ttatctacaa agacgactct 1800
tagccacagc cgcctcactg caccctcaac cacatcctgc aaacagacac cctcgcaca 1860
tccctccaga ttcttccttc cgatgcagcc tacttgctaa cagacgccct ctccacatcc 1920
tgcaaagcat tcctccaaat tcttgcgac ccccgatcc agcattaact gctaagggac 1980
gccctctcca catcctgcta cccaattagc caacggaata acacaagaag gcaggtgagc 2040
agtgacaaag cacgtcaaca gcaccgagcc aagccaaaaa ggagcaagga ggagcaagcc 2100
caagccgag cgcagctct ccaggtcccc ttgcgattgc cgcagcagc agcagacacc 2160
cctctccaca tcccctccgg ccgctaacag cagcaagcca agccaaaaag aagcctcagc 2220
cacagccggt tccgttgcgg ttaccgccga tcacatgcc aaggccgcgc ctttccaaac 2280
gccgagggcc gcccgttccc gtgcacagcc acacacacac ccgcccgcc acgactcccc 2340
atccctattt gaaccacccc gcgcaactgca ttgatcacca atcgcatcgc agcagcacga 2400
gcagcacgcc gtgccgctcc aaccgtctcg cttccctgct tagcttcccg ccgcgccttg 2460
gcgtcgacca aggcacccgg ccccggcgag aagcaccact ccatcgacgc gcagctccgt 2520
cagctggtcc caggcaaggt ctccgaggac gacaagctca tcgagtacga agcgtgctc 2580
gtcgaccgct tcctcaacat cctccaggac ctccacgggc ccagccttcg cgaatttgta 2640
actaaccacc gccgcggccc atttcttctt cgaccggttg ccgcctgcgc gcggcaactgg 2700
tcgtgtcgtg tgctcgtctg tctccctccg gtgcttacta ctgtaatcct tgcaggtcca 2760
ggagtgtctac gaggtaaa 2778

<210> 2

<211> 3089

5 <212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> promotor

10 <222> (1)..(3089)

ES 2 624 276 T3

<400> 2

gacaaaacctc tatatgtaga gtacaggagc ttttacagga ccctgctgga gccagcctta 60
gggggaaaac ttccaggcgg taggtcacat acatcagtga ggtaggagaa atgtgccaac 120
cacgtggtgt cgaccaatct acattctaata ctatatcatt atataattta tcagtttaaa 180
ctttacaaaa tctatctaaa caaatcacat ctacacccat aacattcgtt aaatctaaca 240
cagtatcaaaa actagcgggt caaatcgtat gataacatgt tctcccatat ccattcaaat 300
ctgatagata atattattta gatcatgtat tctctctccc ctctccctcg acgcctcctc 360
ctgcccogtg tcctgacct gtctccctca cttatgatgt tgtctctatc atcaatcgct 420
ccttttataat tgtgatcact gtccaccctt attcctactc gggattaggg atggcaatgg 480
aaaatttctc atcgaggaat agctcttcat acccatccca cgacgcagaa atttcctcgc 540
gggaataccc acgaacgttt acagaagaca tttcttcccc atccatattc cccacgggca 600
taaatttccg acggagatca acgtccctat ttacattata attaggaat gcaccccttg 660
ttattaataa aaacactttc acttatatat attgttagat gtaagaaatc attatgggta 720
tattaaaata aacatatttg tacaatgatt gatctcttac ccaaataatt atttgttttt 780
attattagct agtatacgaa aacatcacca cgtacagggt tgacggattc ccacagaaac 840
agggatgaaa aatacttcta catccctgtc ccgtttacc atctgagaaa gcgggaaatc 900
gggcatagga tccattgccaa aagatcgtag ggctataacc taagcgttgc aacgaagcga 960
agcagacgggt ggagacggtg acgcaaagca atgaacttga acggcatctc tctcgtctggc 1020
cctggccttc tcgaaggctc tgcgtgggtc cttgcgcagt tgcgccgcag cgggctggca 1080
gcacccggaa attgctctt gcgtggcgga gcagacacta aggtactatt ttacgttcta 1140
tttagttgga ctgtggcgggt aaactatgaa aaaaactatt gcagactatg agctattaaa 1200
aagctaaaaa ttatttagtg taaaccacta aaaaccatta aaaattcttt gatatatatt 1260
ttcacagttt tataaaaaat ccaactaaaa caggtcaaat aagctttcaa ttttacta 1320
cgaaaaagtc agcttttaaa aaaaactgct taaatccagt ccttttagttt aatttttatc 1380
tttttaggaaa caaaagccaa aactaaaacc aaaccaaacc tacctttaaa accgatctaa 1440
taggaacgcg gtgtttgga caactagata ttaattttag aggttagacc gccacgaaag 1500
cgtcactgca cacggcattc ccctccccta gcgttatcgt cgcaccataa ataaccatcc 1560
tctcctogcc tttcccaca tctcatcttc gtctgtgttc ttggggctac gcggacacag 1620
ccccgatccg aatcgtcgtc cttgcgagcc tcgccgatcc cccactcccc tcccctcgt 1680
tcaaggtaac tgcgatcctc catcctcccg cttccactct cccttcacct cctctgcttg 1740
ctaggtatac gaacatacga tttattacgg gttatatggg ggcttcgatt cccagatctg 1800
gcgatctatt atcgtagctc cgagtcctcg atctagtaat tgtgggatat gcttgtaaga 1860
ggctctgaga tgggttgggt tgggttgggt cgctgtgacg attccaacag cctcgtttct 1920
tagggttggga tcttctcgtg gtttcctttt taattaaata agtacctgat gcagaatgggt 1980

ES 2 624 276 T3

gcgtcctatt agatggaacc ttgatcttga tgcactaac cttgatcttg ttcgctgtga 2040
 tgattccaac aggctcgttt cttaggcctg ttcgtctggt tcgtcagatc agtttcgttg 2100
 cttttggcct cgttgtaagg tccatccaga tcggagtaga atcgaatgat ttattatacg 2160
 gtagctgctg gtctcattag atttgatctt gcatggggtg aacatatgta ttcataatta 2220
 atatggtgta tacgtactag tttgctggtc ttatTTTTTT agcctgattg cttctgcctt 2280
 tctggcaacg cctgatccac gcgtagctta gagtggattt tagttccttg tttacgcggc 2340
 cacacctgcc gcctagaaaa gctgcagcga gaactcctaat taaatttggg tctacatgtg 2400
 ctagcatata tgtttgtaat taatatgatg gatgaatatg tgcttcagag ttgagttcct 2460
 gttgatgctg tagttctgcc tgaattggtg aggctgtagc ttctgcctga ttaaaatgca 2520
 ccgtgcctat ctgttaaact ctagggtgtg tgatttagcc ggtgacggtg gtttaatatg 2580
 tgtaatttca ctgcttatag taatgcaatt cacctttgct tgaacatgca ttgtcttggt 2640
 gctttgttct atacacatgc ttagctatta tctgatgagc atgcactggt ttgttctggt 2700
 tgatatgcat gctcagaaat atgtagatgt gtggctcctg ctcggttggt ctttatcatc 2760
 cacctgttga acatgcatgt tcttgtcgtt tatctttatt atatattacc ttcgttctcg 2820
 aatatttgtc gcccgctagt tcatttttga actaaaccgt gacaaataaa atagaacgta 2880
 gggagtggca tcatgctgct actgtacctt acggtggcaa ctacatcttg agcacgcata 2940
 tatcttatag tgttcctttt cttttcctcc ttgggtctact gttatatgct tacctTTTTT 3000
 tggtttcctt gcagatccag agtatTTTTT caacaattac caacaacaac aaacaacaaa 3060
 caacattaca attactattt acataaacc 3089

<210> 3

<211> 397

5 <212> ADN

<213> Cestum veneris

<220>

<221> promotor

10 <222> (1)..(397)

<400> 3

ES 2 624 276 T3

```
tggcagacaa agtggcagac atactgtccc acaaatgaag atggaatctg taaaagaaaa      60
cgcgtgaaat aatgcgtctg acaaaggtta ggtcggctgc ctttaatcaa taccaaagtg      120
gtccctacca cgatggaaaa actgtgcagt cggtttgct ttttctgacg acaataaag      180
attcgtggcc gacaggtggg ggtccacat gtgaaggcat cttcagactc caataatgga      240
gcaatgacgt aagggcttac gaaataagta agggtagttt gggaaatgtc cactcaccgg      300
tcagtctata aatacttagc ccctccctca ttgtaaggg agcaaatct cagagagata      360
gtcctagaga gagaaagaga gcaagtagcc tagaagt      397
```

<210> 4

<211> 2195

5 <212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> promotor

10 <222> (1)..(2195)

<400> 4

ES 2 624 276 T3

ccaaaagtct tgaaaaaatt cagcggggag gccattaggg caggggtact gttatgtttt 60
 aaagagaaca ccactttctt gatctcttct aaagagaaat gttttgtaag aaagatcctg 120
 tcctcctcat ccaacctttt catcggcaaa tttttcatag agatattaga ggcaagagag 180
 gggccaaaaa gatccatgta aatggaagtg gccacctggt tgatacctcc ctcatcttca 240
 acagaaaatc cattatgaaa aagtgaatgg attttaaact cttctttttc ttcccttttg 300
 caatgagctg aaaatatctg gtattattct catcaccctc attaataaat ctgtccctag 360
 caatttgctt tctcttgatc ccttctgcag ccaccatggt tottaaattc cactccatat 420
 caagcttttc caatctatca gaatctgaga tggctgcaat ctctctcatt ttctcaagga 480
 tatcgatggt atccataagg tatttcttga acttcttata tttcccttog acatttatat 540
 tccatccttt caacattttt ttgttcaatc ttttttgttt ttttcctttc caaacatcga 600
 tacatttcct gctcctcaca ggtaaggacg agctttcaaa aaacctctg ctttaaagtc 660
 aggtctgagc ctccagcaaa gctcacatat ctaaagtccc tcttcttagt tgggacagag 720
 tcagtgctaa gacacatggg aacatgacca gaaaaaaaa atcatattta gccagagac 780
 aacaatattc ttgtactgca agtctcgta tgggctagca aaggaatcta cccaacttct 840
 caaatgtggt gggatgtcaa gtatatagac tattcatcag ttccaactct atcaaaactgt 900
 gcagctcaat tatagagtgt aataaagtgc tccatctatt tgttcttacc ctcatatttg 960
 gttaagatat taaaatcacc tcccaccaac atttaaagtg caccatttaa agtggctcgc 1020
 gagcaccaaa ccgctgaaaa ccggaatgt ttagcacggt ggcagcgggc cccttttcta 1080
 tctcatcgtg ttcttcgttg tccaccacgg cccacgggcc aacgctcctc catcctgtag 1140
 tgtagagtat attccatttg cgaccgagcc gagcatcgat ccagccacac tggccactgc 1200
 cagccagcca tgtggcactc ctacgtatac tacgtgaggt gagattcact cacatgggat 1260
 gggaccgaga tattttactg ctgtggttgt gtgagagata ataaagcatt tatgacgatt 1320
 gctgaacagc acacaccatg cgtccagata gagaaagctt tctctcttta ttcgcatgca 1380
 tgtttcatta tcttttatca tatatatata acacatatta aatgattctt cgttccaatt 1440
 tataattcat ttgacttttt tatccaccga tgctcgtttt attaaaaaa atattataat 1500
 tattgttact ttttgttgta atattgttta gcatataata aactttgata ctagtatggt 1560
 tccgagcaaa aaaaaatatt aatatttaga ttacgagccc attaatattat tatattcgag 1620

ES 2 624 276 T3

acaagcgaag caaagcaaag caagctaag ttgccctgc tgtgcatgca gaggcccgct 1680
cttgctataa acgaggcagc tagacgcgac tcgactcatc agcctcatca acctcgacga 1740
aggaggaacg aacggacagg ttgttgacaca gaagcgacag atctgctttc gcgccccaaa 1800
cgtcctctc ctctcgtg tcctcggcgt tgcaggcagc tcagtcgccg ccgctgctcc 1860
tgaggcggat ctcgtcgacc gcaacaccga gacggaggta cgacgcggcc gtcgtcgtca 1920
ctaccaccac cactgctaga gctgcggcgg ctgctgtcac ggttcccgcc gccccgccgc 1980
aggcgggccc cgcgccccgg tgccacaaa gcaagcggcg gcacccgcag aggaggagcc 2040
gtccggtgtc ggacaccatg gcggcgctca tggccaaggg caaggttcgt atagtacgcg 2100
cgcgtgctgt cgtcgttatt ttgcgcatag gcgcggacat acacgtgctt tagctagcta 2160
acagctagat catcggtgca gacggcgttc atccc 2195

<210> 5

<211> 1993

5 <212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> promotor

10 <222> (1)..(1993)

<400> 5

ES 2 624 276 T3

ctgcagtgca gcgtgaccgc gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgtcta 60
 agttataaaa aattaccaca tatttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 120
 tctttataca tatatttaaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 180
 tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagtttagac atgggtctaa ggacaattga 240
 gtattttgac aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcatgtgt tctccttttt 300
 ttttgcaaat agcttcacct atataaact tcatccattt tattagtaca tccatttagg 360
 gtttaggggt aatgggtttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt 420
 agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaat aatttagata 480
 taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaacaaat accctttaag aaattaaana 540
 aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgtaa acgccgtcga 600
 cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtccgggcaa gcgaagcaga 660
 cggcacggca tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gagttccgct ccaccgttgg 720
 acttgctccg ctgctggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac 780
 ggacggcggc ctccctctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggattc ctttcccacc 840
 gtccttctgc tttcccttcc tcgcccgcgc taataaatag acaccccctc cacaccctct 900
 ttcccccaacc tegtgtgtt cggagcgcac acacacacaa ccagatctcc cccaatcca 960
 cccgtcggca cctccgcttc aaggtacgcc gctcgtcctc ccccccccc cctctctacc 1020
 ttctctagat cggcgttccg gtccatgggt agggcccgggt agttctactt ctgttcatgt 1080
 ttgtgttaga tccgtgtttg tgttagatcc gtgctgctag cgttcgtaca cggatgcgac 1140
 ctgtacgtca gacacgttct gattgctaac ttgccagtgt ttctctttgg ggaatcctgg 1200
 gatggctcta gccgttccgc agacgggatc gatttcatga tttttttgt ttcgttgcat 1260
 agggtttgggt ttgccctttt cctttatttc aatatatgcc gtgcacttgt ttgtcgggtc 1320
 atcttttcat gctttttttt gtcttggttg tgatgatgtg gtctggttgg gcggtcgttc 1380
 tagatcggag tagaattctg tttcaacta cctggtggat ttattaattt tggatctgta 1440
 tgtgtgtgcc atacatattc atagttacga attgaagatg atggatggaa atacgatct 1500
 aggataggta tacatgttga tgcgggtttt actgatgcat atacagagat gctttttggt 1560
 cgcttggttg tgatgatgtg gtgtggttgg gcggctcgttc attcgttcta gatcggagta 1620
 gaatactggt tcaaaactacc tgggttattt attaatattg gaactgtatg tgtgtgcat 1680
 acatcttcat agttacgagt ttaagatgga tggaaatc gatctaggat aggtatacat 1740
 gttgatgtgg gttttactga tgcataata tgatggcata tgcagcatct attcatatgc 1800
 tctaaccttg agtacctatc tattataata aacaagtatg ttttataatt attttgatct 1860
 tgatatactt ggatgatggc atatgcagca gctatatgtg gattttttta gccctgcctt 1920
 catacgtat ttatttgett ggtactggtt cttttgtcga tgctcaccct gttgtttgggt 1980
 gttacttctg cag 1993

ES 2 624 276 T3

<211> 1992
<212> ADN
<213> Zea mays

5 <220>
<221> promotor
<222> (1)..(1992)

<400> 6

10

```
ctgcagtgca gcgtgaccgc gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgtcta      60
agttataaaa aattaccaca tatttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta      120
tctttataca tatatttaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa      180
tatcagtggt ttagagaatc atataaatga acagtttagac atgggtctaa ggacaattga      240
gtattttgac aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcatgtgt tctccttttt      300
ttttgcaaat agcttcacct atataaactc tcatccattt tattagtaca tccatttagg      360
gtttaggggt aatgggtttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt      420
agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaat aatttagata      480
taaaatagaa taaataaag tgactaaaaa ttaacaaat accctttaag aaattaaaa      540
```

ES 2 624 276 T3

aactaaggaa acatTTTTtct tGtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga 600
cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggcaa gcgaagcaga 660
cggcacggca tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gagttccgct ccaccgttgg 720
acttgctccg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac 780
ggcaggcggc ctctcctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggattc ctttcccacc 840
gtccttctgc tttcccttcc tcgcccgccg taataaatag acacccccctc cacaccctct 900
ttccccaacc tcgtgttgtt cggagcgcac acacacacaa ccagatctcc cccaaatcca 960
cccgtcggca cctccgcttc aaggtacgcc gctcgtcctc ccccccccc ctctctacct 1020
tctctagatc ggcgttccgg tccatggta gggcccggta gttctacttc tgttcatggt 1080
tgtgttagat ccgtgtttgt gttagatccg tctgtctagc gttcgtacac ggatcgcacc 1140
tgtacgtcag acacgttctg attgctaact tgccagtgtt tctctttggg gaatcctggg 1200
atggctctag ccgttccgca gacgggatcg atttcatgat tttttttgtt tcgttgcata 1260
gggtttgggt tgccttttcc ctttatttca atatatgccg tgcacttgtt tgcgggtca 1320
tcttttcatg cttttttttg tcttggttgt gatgatgtgg tctggttggg cggtcgttct 1380
agatcggagt agaattctgt ttcaaacctac ctggtggatt tattaatttt ggatctgtat 1440
gtgtgtgcca tacatattca tagttacgaa ttgaagatga tggatggaaa tatcgatcta 1500
ggataggtat acatgttgat gcgggtttta ctgatgcata tacagagatg ctttttgttc 1560
gcttggttgt gatgatgtgg tgtggttggg cggtcgttca ttcgttctag atcggagtag 1620
aatactggtt caaacctacct ggtgtattta ttaattttgg aactgtatgt gtgtgcata 1680
catcttcata gttacgagtt taagatggat ggaaatatcg atctaggata ggtatacatg 1740
ttgatgtggg ttttactgat gcatatacat gatggcatat gcagcatcta ttcatatgct 1800
ctaaccttga gtacctatct attataataa acaagtatgt tttataatta ttttgatctt 1860
gatatacttg gatgatggca tatgcagcag ctatatgtgg attttttttag ccctgccttc 1920
atacgtatt tatttgcttg gtactgttcc ttttgtcgat gtcaccctg ttgtttgggtg 1980
ttacttctgc ag 1992

<210> 7

<211> 1894

5 <212> ADN

<213> *Oryza sativa*

<220>

<221> promotor

10 <222> (1)..(1894)

<400> 7

ES 2 624 276 T3

ttccaaaatt aagcacacac atttgcaaga actagctagg catgcatata tgataattaa 60
 cggcaagtt gacttcagtt attctgcaga tgtactaaac acataacaag ggatgatcag 120
 ttgcttattt ttttcataac ttgctagggt gcttataact ccagccttct ggacatcgac 180
 caatctctaa acatacttta gcagtgctta caaagtacaa acaactaaat acctctctgc 240
 agatcagtggt ttctaggcac aaattacaca agatagaaaa aaggagaggt tataaattct 300
 tgcttaaaga atatacatgt aaagatgtct aaatagctat aaatgggtaa gcaagatagc 360
 aaagaaggcc agtggccttt gcagctaagc tagctagcta gcccttcttc ctctctttcc 420
 tgctttccct ttgccttctc ctattaatcc tctgcacctc acacagcagc agaaaacca 480
 ccaactggag ctctcctttc ctactccaag aaacgaaggt agagaaagaa agatcagatc 540
 agcttcagga ccaatthttag ctagggtata tatctctttg cgtgctaagtg tgthtttagtt 600
 atctgggtgt gtgtagagtt ctttgthtaag gcactgattc agctgcagtt tagattcaag 660
 tttgtatgth ctctctttga ggaaaagaaa ccctthttcct gtgcttogag thctthgcaaa 720
 gagaaactgt gatgctthggc thccagthttg atgctthctth gthcagattg gaaattcttc 780
 cttagctthctt thctctattth tgtagcaagg atthctthccg gccagtgat cctggthttct 840
 ththggaaggt thcagththth thgththctth thgaaathth thctththgct thaggcagat 900
 cththgatctt gtgaggagac aggagaaaag gaagaagctg gththctthgct gccgacctct 960
 tgctthctcac ththtgatga gthththctth gthcaathctt agctagatat gthaaagatag 1020
 thtagthtaagc aaatcgaaat tgctagctth thccatgctth ththaaacatg atthctthcaga 1080
 ththggthggth thctthththth cctthththth gagacgtgct gthctthgcat ththctthctc 1140
 thgattcatc thcccatctg gthctththgag cththctthth cgtthctthctc ththcattatt 1200
 thgagcaatc ththgcacatc thgaaagthth gththctthgag actactthth cttagatctth 1260
 ththactcgat cactctatac ththcatctag gthctctthct aaataggcga thgattgagct 1320
 thgctthattg caaatgatgg gatagatatt gthccagthct ccaaththth thccatctccg 1380
 ccaagthctth catcatctth thctthctth ththtaggca aaathcatct ththctththca 1440
 aagthcagct thththctct gthththctth thththtagct tagctggthth ththctthctth 1500
 ththgatttac atgtataaaa catgctthgaa thththtagat cgatcactth atacacatac 1560
 ththgtgaatc acgatctcag atctctcag atagththgaa thcaththth ththtagatcga 1620
 thcagctgth atgtagtact gthaaatcact actagatctth thcatcagthct thththctgca 1680
 thctatcaatt thctcatgca gthththtagth thctththth cggthctctc thctthththth 1740
 aatcagctga gagthththgth ththctththaa thcaththth atctthctc agthctctct 1800
 thctctgcatc ththcaactth ctcatgcaat gththththgct thctththgac thgactctgth 1860
 thctctththth thththgacg ththgagcaaa gaag 1894

5 <210> 8
 <211> 2557
 <212> ADN

ES 2 624 276 T3

<213> Zea mays

<220>

<221> promotor

5 <222> (1)..(2557)

<400> 8

ttgcacatga caacaattgt aagaggatgg agaccacaac gatccaaca tactttctgcg	60
acgggctgtg aagtatagag aagttaaacg cccaaaagcc attgtgtttg gaatttttag	120
ttattctatt tttcatgatg tatcttctct taacatgcct taatttgcaa atttgggata	180
actactgatt gaaaatata gtatgtaaaa aaatactaag catatttgtg aagctaaaca	240
tgatgttatt taagaaaata tgttgtaaac agaataagat taatatcgaa atggaaacat	300
ctgtaaatta gaatcatctt acaagctaag agatgttcac gctttgagaa acttcttcag	360
atcatgaccg tagaagtagc tctccaagac tcaacgaagg ctgctgcaat tccacaaatg	420
catgacatgc atccttgtaa ccgctcgtcg cgctataaac acggataact caattccctg	480
ctccatcaat ttagaaatga gcaagcaagc acccgatcgc tcaccccata tgcaccaatc	540
tgactcccaa gctctgtttc gcattagtag cgccagcact ccacctatag ctaccaattg	600
agacctttcc agcctaagca gatcgattga tcgttagagt caaagagttg gtggtacggg	660
tactttaact accatggaat gatggggcgt gatgtagagc ggaaagcgcc tccctacgcg	720
gaacaacacc ctgcctatgc cgctcgacta cagcctcctc ctcgctcggcg ccacaacgag	780
ggagcccgtg gtgcgagcca ccgaccagca tgtctctgtg tectcgtccg acctcgacat	840
gtcatggcaa acagtcggac gccagcacca gactgacgac atgagtctct gaagagcccg	900
ccacctagaa agatccgagc cctgctgctg gtagtggtaa ccattttcgt cgcgctgacg	960
cggagagcga gaggccagaa atttatagcg actgacgctg tggcaggcac gctatcggag	1020
gttacgacgt ggccgggtcac tcgacgcgga gttcacaggt cctatccttg catcgtcgg	1080
cgcgaggttt acggggactt atccttacga cgtgctctaa gggtgcgata acgggaggag	1140
gaaggcgtgt ggcgtgcgga gacggtttat acacgtagtg tgccgggagtg tgtttcgtag	1200
acgcgggaaa gcacgacgac ttacgaaggt tagtggagga ggaggacaca ctaaaatcag	1260
gacgcaagaa actcttctat tatagtagta gagaagagat tataggagtg tgggttgatt	1320
ctaaagaaaa tcgacgcagc acaaccgtca aaacgggtgc tttaatatag tagatatata	1380
tatatagaga gagagagaaa gtacaaagga tgcatttgtg tctgcatatg atcggagtat	1440
tactaacggc cgtcgttaaga aggtccatca tgcgtggagc gagcccatth gggtggttgt	1500
caggccgag ttaaggcctc catatatgat tgtcgtcggg ccataacag catctcctcc	1560
accagtttat tgtaagaata aattaagtag agatatttgt cgtcgggcag aagaaacttg	1620
gacaagaaga agaagcaagc taggccaatt tcttgccggc aagaggaaga tagtggcctc	1680

ES 2 624 276 T3

tagtttatat atcggcgtga tgatgatgct cctagctaga aatgagagaa gaaaaacgga 1740
 cgcgtgtttg gtgtgtgtca atggcgtcca tccttccatc agatcagaac gatgaaaaag 1800
 tcaagcacgg catgcatagt atatgtatag cttgttttag tgtggctttg ctgagacgaa 1860
 tgaagcaac ggcgggcata ttttccagtg gctgtagctt tcaggctgaa agagacgtgg 1920
 catgcaataa ttcaggggaat tcgtcagcca attgaggtag ctagtcaact tgtacattgg 1980
 tgcgagcaat tttccgcaact caggagggct agtttgagag tccaaaaact ataggagatt 2040
 aaagaggcta aaatcctctc cttatttaat tttaaataag tagtgtattt gtattttaac 2100
 tcctccaacc cttccgattt tatggctctc aaactagcat tcagtctaata gcatgcatgc 2160
 ttggctagag gtcgtatggg gttgttaata gcatagctag ctacaagtta accgggtcct 2220
 ttatatttaa taaggacagg caaagtatta cttacaaata aagaataaag ctaggacgaa 2280
 ctgctggatt attactaaat cgaaatggac gtaatatcc aggcaagaat aattgttcga 2340
 tcaggagaca agtggggcat tggaccggtt cttgcaagca agagcctatg gcgtggtgac 2400
 acggcgcggt gccatacat catgcctcca tcgatgatcc atcctcactt gctataaaaa 2460
 gaggtgtcca tgggtgctcaa gctcagccaa gcaaataaga cgacttgttt cattgattct 2520
 tcaagagatc gagcttcttt tgcaccacaa ggtcagag 2557

<210> 9

<211> 2315

5 <212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> promotor

10 <222> (1)..(2315)

<400> 9

ES 2 624 276 T3

cttagaggca	acccaagata	ggtgaaagat	aagctacctt	tgtcacaatt	gaagattcgt	60
gcaaggtggt	tcaactatta	ttctgagatg	tttattggga	ccattgagga	cctttgagta	120
attaactctc	aaccttgtgg	aaattcgtta	ccaactgggt	tgcataggat	ttcatgatta	180
agagtgtggt	tggtttagct	gtgagttttc	tcctatgaaa	aaactgttgt	gagaaaaaat	240
agttggaagt	cgtttagttc	aaactgttgt	gagttatcca	ctgtaaacaa	attgtatatt	300
gtttatatac	actctgttta	aatatatctc	ttaatcagta	tatataatta	aaaaactaat	360
ttcacatttg	tgttcctaata	atTTTTTaca	aataaatcat	tgTTTaatTC	catttgtaata	420
aagTTTTTat	taaaattgct	tttatttcat	ttattataaa	catttaattg	ttttaatcct	480
atTTtagTTT	taatttatg	tatctattta	ttaatataac	gaacttcgat	agaaacaaa	540
agcaaggtca	aggtgttttt	tcaaagtagt	tgtggaaaag	ctgaaccct	tttattcaac	600
ttttagaagc	aggaaaacag	aaccaaacag	accctaaaaa	tgtgtgaatt	tttagcaggt	660
taattattcg	catctctttg	gtcatgttta	agaggctgga	atagatcaac	tgcaagaaca	720

ES 2 624 276 T3

catagcagag tggatagggg gggggggggg ggggggaggg tcgtcgtctc cctatctgac 780
 ctctcttctg cattggattg cctttttcgg tactctatctt aaaacttaaa agtacaaatg 840
 aggtgccgga ttgatggagt gatataaag tttgatgtgt ttttcacata agtgacaagt 900
 attattgaaa gagaacattt gcattgctac tgtttgcata tgggaaaatt gagaattgta 960
 tcatgccatg gccgatcagt tctttactta gctcgatgta atgcacaatg ttgatagtat 1020
 gtcgaggatc tagcgatgta atggtgtag gacacgtggt tagctactaa tataaatgta 1080
 aggtcattcg atggtttttc tattttcaat tacctagcat tatctcattt ctaattgtga 1140
 taacaaatgc attagacat aattctgtaa atatgtacat ttaagcacac agtctatatt 1200
 ttaaaattct tctttttgtg tggatatccc aaccctctctc cacctctctc ttcaatccgt 1260
 gcatgttcac cgctgccaaag tgccaacaac acatcgcacg gtgcatactt ttgttggtt 1320
 gtgcacggtc ggcgccaatg gaggagacac ctgtacggtg cccttggtag aacaacatcc 1380
 ttatccctat atgtatggtg cccttcgtag aatgacaccc cttatcccta caatagccat 1440
 gtatgcatac caagaattaa atatactttt tcttgaacca caataattta ttatagcggc 1500
 acttcttggt caggttgaac acttatttgg aacaataaaa tgccgagttc ctaaccacag 1560
 gttcactttt ttttttctt atcctcctag gaaactaaat tttaaaatca taaatttaat 1620
 ttaaatgtta atggaacaa aaaattatct acaaagacga ctcttagcca cagcgcctc 1680
 actgcaccct caaccacatc ctgcaaacag acaccctcgc cacatccctc cagattcttc 1740
 actccgatgc agcctacttg ctaacagacg ccctctccac atcctgcaa gcatctctcc 1800
 aaattcttgc gatccccga atccagcatt aactgctaag ggacgccctc tccacatcct 1860
 gctaccaat tagccaacgg aataacaaa gaaggcaggt gagcagtgac aaagcacgtc 1920
 aacagcaccg agccaagcca aaaaggagca aggaggagca agccaagcc gcagccgcag 1980
 ctctccaggt ccccttgca ttgccgccag cagtagcaga caccctctc cacatcccct 2040
 ccggccgcta acagcagcaa gccaaagcaa aaaggagcct cagccgcagc cggttccgtt 2100
 gcggttaccg ccgatcacat gcccaaggcc gcgcctttcc gaacgccgag gccgccctt 2160
 tcccgtgcac agccacacac acaccgcccc gccaacgact ccccatccct atttgaaccc 2220
 acccgcgcac tgcattgatc accaatgca tcgcagcagc acgagcagca cggcgtgccg 2280
 ctccaacat ctgccttccg tgcttagctt cccgc 2315

<210> 10

<211> 2071

5 <212> ADN

<213> *Oryza sativa*

<220>

<221> promotor

10 <222> (1)..(2071)

ES 2 624 276 T3

<400> 10

tocatgctgt cctactactt gcttcatccc ettctacatt ttgttctggt ttttggectg	60
catttcggat catgatgtat gtgatttcca atctgctgca atatgaatgg agactctgtg	120
ctaaccatca acaacatgaa atgcttatga ggcctttgct gagcagccaa tcttgccctg	180
gtttatgtct tcacaggccg aattcctctg ttttgttttt caccctcaat atttgaaac	240
atztatctag gttgtttggt tccaggccta taaatcatac atgatggtgt cgtattggat	300
gtgaatgtgg tggcgtgttc agtgccttgg atttgagttt gatgagagtt gcttctgggt	360
caccactcac cattatcgat gctcctcttc agcataaggt aaaagtcttc cctgtttacg	420
ttattttacc cactatgggt gcttgggttg gttttttcct gattgcttat gccatggaaa	480
gtcatttgat atgttgaact tgaattaact gtagaattgt atacatgttc catttgtggt	540
gtacttcctt cttttctatt agtagcctca gatgagtggt aaaaaaacag attatataac	600
ttgccctata aatcatttga aaaaaatatt gtacagtgag aaattgatat atagtgaatt	660
tttaagagca tgttttccta aagaagtata tattttctat gtacaaaggc cattgaagta	720
attgtagata caggataatg tagacttttt ggacttacac tgctacctt aagtaacaat	780
catgagcaat agtgttgcaa tgatatttag gctgcattcg tttactctct tgatttccat	840
gagcacgctt cccaaactgt taaactctgt gttttttgcc aaaaaaaaaat gcataggaaa	900
gttgctttta aaaaatcata tcaatccatt tttaagtta tagctaatac ttaattaatc	960
atgcgctaata aagtcactct gtttttcgta ctagagagat tgttttgaac cagcactcaa	1020
gaacacagcc ttaaccagc caaataatgc tacaacctac cagtccacac ctcttgtaaa	1080
gcatttggtg catggaaaag ctaagatgac agcaacctgt tcaggaaaac aactgacaag	1140
gtcatagggg gagggagctt ttggaaagg gccgtgcagt tcaaaacaatt agttagcagt	1200
agggtgttgg tttttgctca cagcaataag aagttaatca tgggttaggc aaccctaaata	1260
aaacaccaaa atatgcacaa ggcagtttgt tgtattctgt agtacagaca aaactaaaag	1320
taatgaaaga agatgtggtg ttagaaaagg aaacaatata atgagtaatg tgtgggcatt	1380
atgggaccac gaaataaaaa gaacattttg atgagtcgtg tatcctcgat gagcctcaaa	1440
agttctctca ccccggataa gaaaccctta agcaatgtgc aaagtttgca ttctccactg	1500
acataatgca aaataagata tcatcgatga catagcaact catgcatcat atcatgcctc	1560
tctcaacctt ttcattccta ctcatctaca taagtatctt cagctaaatg ttagaacata	1620
aaccataag tcacgtttga tgagtattag gcgtgacaca tgacaaatca cagactcaag	1680
caagataaag caaaatgatg tgtacataaa actccagagc tatatgtcat attgcaaaaa	1740
gaggagagct tataagacaa ggcattgactc acaaaaattc atttgccttt cgtgtcaaaa	1800
agaggagggc tttacattat ccatgtcata ttgcataaaga aagagagaaa gaacaacaca	1860
atgctgcgtc aattatacat atctgtatgt ccatcattat tcatccacct ttcgtgtacc	1920
acattcata tatcatgagt cacttcatgt ctggacatta acaactcta tcttaacatt	1980
tagatgcaag agcctttatc tcactataaa tgcaacgatga tttctcattg tttctcacia	2040
aaagcattca gttcattagt cctacaacaa c	2071

ES 2 624 276 T3

<210> 11

<211> 194

<212> ADN

<213> Virus del mosaico de la escrofularia

5

<220>

<221> potenciador

<222> (1)..(194)

10

<400> 11

```

agctgcttgt ggggaccaga caaaaaagga atggtgcaga attgtaggc gcacctacca      60
aaagcatctt tgcctttatt gcaaagataa agcagattcc tctagtacaa gtggggaaca      120
aaataacgtg gaaaagagct gtctgacag cccactcact aatgcgtatg acgaacgcag      180
tgacgaccac aaaa                                         194
    
```

<210> 12

15

<211> 293

<212> ADN

<213> Virus del mosaico de la coliflor

<220>

20

<221> potenciador

<222> (1)..(293)

<400> 12

25

```

acttttcaac aaaggtaat atccgaaac ctctcggat tccattgcc agctatctgt      60
cactttattg tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaagcca tcattgcgat      120
aaaggaaagg ctatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggacccccca      180
cccacgagga gcatcgtgga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat      240
tgatgtgata tctccactga cgtaagggat gacgaacaat cccactatcc ttc          293
    
```

<210> 13

<211> 68

<212> ADN

ES 2 624 276 T3

<213> Virus del mosaico del tabaco

<220>

<221> potenciador

5 <222> (1)..(68)

<400> 13

gtatattttac aacaattacc aacaacaaca aacaacaac aacattacaa ttactattta 60
cataaacc 68

10

<210> 14

<211> 2221

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Gen GUS optimizado de maíz

<220>

20 <221> gen

<222> (1)..(2221)

<400> 14

ES 2 624 276 T3

atggtacgtc ctgtagaaac cccaaccctg gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca	60
ttcagctctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaaag cgcgttacia	120
gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt ttaacgac agttcgccga tgcagatatt	180
cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca	240
ggccagcgtg tcgtgctgcg tttcgatgcg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat	300
aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccg	360
tatgttattg cgggaaaaag tgtacgtatc accgtttgtg tgaacaacga actgaactgg	420
cagactatcc cgccgggaat ggtgattacc gacgaaaacg gcaagaaaaa gcagtcttac	480
ttccatgatt tctttaacta tgccggaatc catcgcagcg taatgctcta caccacgccg	540
aacacctggg tggacgatat caccgtggtg acgcatgtcg cgcaagactg taaccacgcg	600
tctgttgact ggcaggtacc aagctgcgaa tcttcgtttt ttaaggaat tctcgatctt	660
tatggtgat aggctctggg ttttctgttt ttgtatctc ttaggatttt gtaaattcca	720
gatctttcta tggccactta gtagtatatt tcaaaaattc tccaatcgag ttcttcattc	780
gcattttcag tcattttctc ttcgacgttg tttttaagcc tgggtattac tcctatttag	840
ttgaactctg cagcaatctt agaaaattag ggttttgagg tttcgatttc tctaggtaac	900
cgatctattg cattcatctg aatttctgca tatatgtctt agatttctga taagcttacg	960
atacgttagg tgtaattgaa gtttatTTTT caagagtgtt atTTTTgtt tctgaatttt	1020
tcaggtggtg gccaatggtg atgtcagcgt tgaactgcgt gatgcggatc aacaggtggt	1080
tgcaactgga caaggcacta ggggacttt gcaagtggtg aatccgcacc tctggcaacc	1140
gggtgaaggT tatctctatg aactgtgcgt cacagccaaa agccagacag agtgtgatat	1200
ctaccgcctt cgcgtcggca tccggtcagt ggcagtgaag ggccaacagt tcctgattaa	1260
ccacaaaccg ttctacttta ctggctttgg tcgtcatgaa gatgcggact tgcgtggcaa	1320
aggattcgat aacgtgctga tgggtcacga ccacgcatta atggactgga ttggggccaa	1380
ctcctaccgt acctcgatt acccttacgc tgaagagatg ctcgactggg cagatgaaca	1440
tggcatcgtg gtgattgatg aaactgctgc tgtcggcttt aacctctctt taggcattgg	1500

ES 2 624 276 T3

```

tttccaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcga gaggcagtca acggggaaac      1560
tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg cgtgacaaaa accacccaag      1620
cgtggtgatg tggagtattg ccaacgaacc ggatacccg cgcgaagtg cacgggaata      1680
tttcgcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgaccg acgcgtccga tcacctgct      1740
caatgtaatg ttctgcgacg ctcacaccga taccatcagc gatctctttg atgtgctgtg      1800
cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat ttggaaacgg cagagaaggt      1860
actggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat cagccgatta tcatcaccga      1920
atacggcgtg gatacgttag ccgggctgca ctcaatgtac accgacatgt ggagtgaaga      1980
gtatcagtgt gcatggctgg atatgtatca ccgcgtcttt gatcgcgtca gcgcgctct      2040
cggtgaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg caaggcatat tgcgcgttgg      2100
cggtaacaag aaagggatct tcactcgcga ccgcaaaccg aagtcggcgg cttttctgct      2160
gcaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaaccg cagcagggag gcaaaaatg      2220
a                                                                                   2221

```

<210> 15

<211> 2226

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Endoglucanasa optimizada de maíz

10

<220>

<221> gen

<222> (1) .. (2226)

15 <400> 15

ES 2 624 276 T3

atgcgcgtgc tgetcgttgc gctggccctg ctggetctgg ccgcttctgc gacctctgcc	60
acccagggcg ctctggacag cgccgtgact gcgctccaat ccgctatcac caccttcagc	120
ggtgctcgcc aggatggcgc caagaccagc ggcttcacca gcgccaggt gaccgcctg	180
atcaacagcg ccaaggccga caaggagggc gtccgcactt ctgctaacgg cgacgacgtg	240
tccccggtgg agtactgggt gaacagcagc gtgctgggcg cgttcaatgc tgccatcacc	300
gccctcgaga acgccagcgg ccagagcgct atcgacgccg cctacctggc tctcatccag	360
gccggcaaga cgttcaatga cgcgaagcgc cacggcacca cccagacag gaccgcctc	420
aacaacgcga tcaccgccgc tgtgaacgcc aagaacggcg tccagaccgc cgctgacaag	480
gaccaggcca gcctgggcag cagctgggct accggcgctc agttcaacgc cctgaacacc	540
gccatcgaca gcgccaccgc cgtgaagaac aacgccaacg ccaccaaggc cagcgtggac	600
accgccgctg ccagcctgaa cgccgcgatc gccaccttca ccaccgccgt caccaacaac	660
ggcccaggca cccagacctt ccgcgacatc accgctgccc agctcgtggc cgagatcaag	720

ES 2 624 276 T3

atcggctgga acctgggcaa cagcctggac gccacaacg gttccccggc caaccaacc 780
 gtggaccaga tggaacgcgg ctggggcaac ccagccacca ccaaggcgaa catcaccgag 840
 ctgaagaacg ccggcttcaa cgccatccgc atccccgtgt cctggaccaa ggccgccagc 900
 ggcgctccga actacaccat ccgcaccgac tggatgacct gcgtgaagga gatcgtcaac 960
 tacgccgtgg acaacgacat gtacatcatc ctgaacaccc accacgacga ggacgtgctg 1020
 accttcatga acagcaacgc cgctgccggc aagcccgct tccagaagct gtgggagcag 1080
 atcgcgctg cttcaagga ctacaacgag aagctgatct tcgagggcct gaacgagcca 1140
 aggaccccgg gcagcagcaa cgagtggaa ggcggcaccg acgaggagcg caacaacctg 1200
 aacagctact acccgatctt cgtgaacact gtgcgcagca gcggcgcaa caacggcaag 1260
 cgcacctga tgatcaacc ctacgccgc agcatggaag ccgtggccat gaacgcctg 1320
 accctgccag ccgactccgc cgccaacaag ctgatcgtgt cttccacag ctaccagccg 1380
 tacaacttcg ccctgaacaa ggacagcagc atcaacacct ggtccagcag cagctccggc 1440
 gacaccagcc caatcaccgg cccgatcgac cgctactaca acaagttcgt gtcccagggc 1500
 atccccgtga tcatcggcga gttcggcgcc atgaacaaga acaacgaggc tgtgcgcgcc 1560
 cagtgggccc agtactacgt gtcctacgcc cagagcaagg gcatcaagtg cttctgggtg 1620
 gacaacggcg tgaccagcgg ctctggcgag ctgttcggcc tgctgaaccg caccaacaac 1680
 acctcacct acaacgccct gctgaacggc atgatgagcg gcaccggcgg cactgtgcc 1740
 acgccacca ccctccggc caccacaacc ccgccaacca ccatcaccgg caacctgggc 1800
 acctaccagt tcggcacca ggagacggc gttccccca actacacca ggctgtgtgg 1860
 gagctgtccg gcacgaatct gacgaccgcc aagaccagcg gcgccaagct ggtgctggtg 1920
 ttcaccaccg cgccgaacgc cagcatgcac ttgtgtggc agggccagc taatagcctg 1980
 tggtggaacg agaaggagat cctgggcaac accggcaacc catctgctac ggcggttacc 2040
 tggaacagcg gcaccaagac cctgaccatc ccgctgaccg ccaacagcgt gaaggactac 2100
 tccgtgttca ccgccagcc gagcctgcgc atcatcatcg cctactaaa cggcggcaac 2160
 gtgaacgacc tgggcatcgt gtccgcaac ctgaccagc acgagctgaa ggccgaggcc 2220
 aagtga 2226

<210> 16

<211> 1590

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen CBHI optimizado de maíz

10

<220>

ES 2 624 276 T3

<221> gen

<222> (1)..(1590)

<400> 16

5

```

atgcgcgtgc tgctcgtggc cctggccctg ctggctcttg ctgccagcgc cacctctcag      60
cagatcggca cctacaccgc cgagaccac ccaagcctga gctggtccac ctgcaagagc      120
ggcggttcct gcacgaccaa cagcggcgcc atcacccctg atgcgaactg gcgctgggtg      180
cacggcgtga acaccagcac caactgctac acgggtaaca cgtggaacac cgccatctgc      240
gacacggacg cttcctgcgc ccaggactgc gcgcttgatg gcgccgacta ctccggcacc      300
tacggcatca ccacctccgg caacagcctg cgectgaact tcgtgaccgg cagcaatgtg      360
ggcagccgca cctacctgat ggccgacaac acccactacc agatcttoga cctgctgaac      420
caggagtcca ccttcaccgt cgacgtgtcc cacctgccct gggcctgaa cggcgcctc      480
tacttcgtga cgatggacgc cgacggcggc gtgtccaagt acccgaacaa caaggctggc      540
gcccagtacg gtgtgggcta ctgcgacagc cagtgccca gggacctgaa gttcatcgcc      600
ggccaggcca acgtggaggg ctggaccccg agcagcaaca acgccaacac cggcctgggc      660
aaccacggcg cctgctgcgc cgagctggac atctgggagg ccaacagcat cagcagggcc      720
ctgacccac acccatgcga caccacaggc ctgtctgtgt gcaccaccga cgctcgggc      780
ggcacctact ccagcgaccg ctacgccggc acctgcgacc cagacggctg cgacttcaac      840
ccgtaccgcc tgggcgtgac cgacttctac ggacgggca agaccgtgga caccaccaag      900
ccgatcaccg tggtgacca gttcgtgacc gacgacggca ccagcaccgg caccctgagc      960
gagatccgcc gctactacgt ccagaacggc gtggtgatcc cgcagccgag cagcaagatc     1020
agcggcgtgt ccggcaacgt gatcaacagc gacttctgcg acgccgagat cagcaccttc     1080
ggcgagaccg ccagcttcag caagcacggc ggccctggcca agatgggcgc tggcatggaa     1140
gccggcatgg tgctggtgat gagcctgtgg gacgactact ccgtgaacat gctgtggctg     1200
gacagcacct acccgaccaa cgccaccggg acgccaggcg ctgccagggg cagctgccca     1260
accacctcgg gcgaccccaa gaccgtcgag agccagagcg gcagcagcta cgtgaccttc     1320
agcgacatcc gcgtgggccc gttcaactcc acgttcagcg gtggctctag cacgggcggc     1380
tcctccacca ccaccgccag cggcaccacc accaccaagg cctccagcac gtctactagc     1440
tccacctcta ccggcaccgg cgttgctgcc cattggggcc agtgcggtgg ccagggtgg     1500
acgggtcaa cgacttgcgc ctccggcacc acctgcaccg tggtaaatcc gtactactcc     1560
cagtgcctga gcgagaagga cgagctgtga      1590

```

<210> 17

<211> 1596

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CBHI optimizado de maíz

5

<220>

<221> gen

<222> (1)..(1596)

10

<400> 17

ES 2 624 276 T3

atgcgcgtgc tgetcgtggc cctggccctg ctggetcttg ctgccagcgc cacctctcag 60
cagatcggca cctacaccgc cgagacccac ccaagcctga gctggtccac ctgcaagagc 120
ggcggttcct gcacgaccaa cagcggcgcc atcacccttg atgcgaactg gcgctgggtg 180
cacggcgtga acaccagcac caactgctac acgggtaaca cgtggaacac cgccatctgc 240
gacacggacg cttcctgcgc ccaggactgc gcgcttgatg gcgccgacta ctccggcacc 300
tacggcatca ccacctccgg caacagcctg cgcctgaact tctgaccggc cagcaatgtg 360
ggcagccgca cctacctgat ggccgacaac acccactacc agatcttcga cctgctgaac 420
caggagttca ccttcaccgt cgacgtgtcc cacctgccct gcggcctgaa cggcgcctc 480
tacttcgtga cgatggacgc cgacggcggc gtgtccaagt acccgaacaa caagctggc 540
gccagtagc gtgtgggcta ctgcgacagc cagtgccca gggacctgaa gttcatcgcc 600
ggccaggcca acgtggaggg ctggaccccg agcagcaaca acgccaacac cggcctgggc 660
aaccacggcg cctgctgcgc cgagctggac atctgggagg ccaacagcat cagcagggcc 720
ctgacccac acccatgcca caccaccggc ctgtctgtgt gcaccaccga cgctcgggc 780
ggcacctact ccagcgaccg ctacgccggc acctgcgacc cagacggctg cgacttcaac 840
ccgtaccgcc tgggcgtgac cgacttctac ggcagcggca agaccgtgga caccaccaag 900
ccgatcaccg tgggtgacca gttcgtgacc gacgacggca ccagcaccgg caccctgagc 960
gagatccgcc gctactacgt ccagaacggc gtggtgatcc cgcagccgag cagcaagatc 1020
agcggcgtgt ccggcaacgt gatcaacagc gacttctgcg acgccgagat cagcaccttc 1080
ggcgagaccg ccagcttcag caagcacggc ggcctggcca agatgggcgc tggcatggaa 1140
gccggcatgg tgetggtgat gagcctgtgg gacgactact ccgtgaacat gctgtggctg 1200
gacagcacct acccgaccaa cgccaccggg acgccaggcg ctgccagggg cagctgcca 1260
accacctcgg gcgaccccaa gaccgtcgag agccagagcg gcagcagcta cgtgaccttc 1320
agcgacatcc gcgtgggccc gttcaactcc acgttcagcg gtggctctag cacggcgggc 1380
tcctccacca ccaccgccag cggcaccacc accaccaagg cctccagcac gtctactagc 1440
tccacctcta ccggcaccgg cgttgctgcc cattggggcc agtgcggtgg ccagggctgg 1500
acgggtccaa cgacttgcgc ctccggcacc acctgcaccg tggatcaatcc gtactactcc 1560
cagtgcctgg acgagctgaa ggccgaggcc aagtga 1596

<210> 18

<211> 1943

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> iARN de R1 de maíz

ES 2 624 276 T3

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1943)

5 <400> 18

gatgaccttg actctcccaa gttacttggg tacccaagca agccaattgg tctcttcata	60
aggcaatcaa tcatcttccg ttccgactcc aacggtgagg acctggaagg ttatgctgga	120
gcaggattat atgatagcgt accgatggat gaggaggatg aggttgact tgattacaca	180
actgaccctc ttatagtaga ccgtggattc cgaagctcaa tcctctcaag catagcacgg	240
gctggccatg ccatcgagga gctatacggg tctcctcagg acgtcgaggg agtagtgaag	300
gatggaaaaa tctatgtagt ccagacaaga ctcgagacct agctttcttg taaaaagtgg	360
ttggcgccaa agggcgaatt cactagtaag ctggggcccg cggccgcagg tatgttgctt	420
ccattgccaa actgttcctt tttaccata ggctgattga tcttggtgt gtgattttt	480
gcttggtttt ttgagctgat tcagcggcgc ttgcagcctc ttgatcgtgg tcttggtcgc	540
cccatttctt gcgattcttt ggtgggtcgt cagctgaatc ttgcaggagt tttgctgac	600
atgttcttgg gtttactgct ttcggtaaat ctgaaccaag aggggggttt ctgctgcagt	660
ttagtgggtt tactatgagc ggattcgggg ttctgaggaa aaccggcaa aaacctcaa	720
tcctcgacct ttagttttgc tgccacggtg ctccgcccc ttgcagagt cttttgccc	780
ccaaatttt ttttacttgg tgcagtaaga atcggcctc agtgattttc tcgactcgta	840
gtccgtgat actgtgtctt gcttatcact tgttctgctt aatcttttt gcttctgag	900
gaatgtcttg gtgcctgtcg gtggatggcg aacaaaaat gaagggttt tgtttttga	960
actgagaaaa atcttgggt ttttggttg attcttcat ggagtcgca ccttccgtat	1020
tcttctctt gatctcccc cttgcggatt cataatattc ggaactcat gttggtctg	1080
cttaatctgt agccaatct tcatatctcc agggatcttt cgctctgtcc tatcggattt	1140
aggaattagg atctaactgg tgctaatact aaagggtaat ttggaacct gccattataa	1200
tttgcaaag tttgaggtat gccatcggta tctcaatgat acttactaaa acccaaaaa	1260
tccatttgat aaagctggtt cttttatccc ttgaaaaca ttgtcagagt atattggttc	1320
aggttgattt attttgaatc agtactcgca ctctgcttcg taaacctag atgcttcag	1380
ttgtgtagat gaaacagctg tttttagtta tgttttgatc ttccaatgct tttgtgtgat	1440
gttattagtg ttgatttagc atggctttcc tgttcagaga tagtcttgca atgcttagtg	1500
atggctgttg actaattatt cttgtgcaag tgagtgggtt tggtagctgt tgctaagtgt	1560
aacctttctt tgcagggcgc caaccacttt gtacaagaaa gctgggtctc gagtcttgtc	1620
tggactacat agatttttcc atccttcaact actccctcga cgtcctgagg agaaccgtat	1680

ES 2 624 276 T3

agctcctcga tggcatggcc agcccgtgct atgcttgaga ggattgagct tcggaatcca 1740
 cggctacta taagagggtc agttgtgtaa tcaagtacaa cctcatcctc ctcatccatc 1800
 ggtacgctat catataatcc tgctccagca taaccttcca ggtcctcacc gttggagtcg 1860
 gaacggaaga tgattgattg ccttatgaag agaccaattg gcttgcttgg gtaaccaagt 1920
 aacttgggag agtcaaggtc atc 1943

<210> 19

<211> 561

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Xilanasa optimizada de maíz

10

<220>

<221> gen

<222> (1)..(561)

15

<400> 19

atggctagca cggactactg gcaaaactgg accgacggcg gcggcaccgt gaacgctacc 60
 aacggcagcg acggcaacta cagcgtgagc tggagcaact gcggcaactt cgtggtgggc 120
 aagggtgga ccaccggcag cgctaccagg gtgatcaact acaacgctgg cgctttcagc 180
 ccaagcggca acggctactt ggctttgtac ggctggacca ggaacagctt gatcgagtac 240
 tacgtggtgg acagctgggg cacctacagg ccaaccggca cctacaaggg caccgtgacc 300
 agcgacggcg gcacctacga catctacacc accaccagga ccaacgctcc aagcatcgac 360
 ggcaacaaca ccaccttac ccaattctgg agcgtgaggc aaagcaagag gccaatcggc 420
 accaacaaca ccatcacctt cagcaacat gtgaacgctt ggaagagcaa gggcatgaac 480
 ttgggcagca gctggageta ccaagtgtt gctaccgagg gctaccaaag cagcggctac 540
 agcaacgtga ccgtgtggtg g 561

20 <210> 20

<211> 1848

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 624 276 T3

<220>

<223> Gen cry1Ab optimizado de maíz

<220>

5

<221> gen

<222> (1)..(1848)

<400> 20

```
          atggacaaca accccaacat caacgagtgc atcccctaca actgcctgag caaccccgag      60
10      gtggaggtgc tgggcggcga gcgcatcgag accggctaca ccccatcga catcagcctg      120
```

ES 2 624 276 T3

agcctgaccc agttcctgct gagcgagttc gtgcccgccg ccggcttcgt gctgggcctg 180
 gtggacatca tctggggcat cttcggcccc agccagtggg acgccttcct ggtgcagatc 240
 gagcagttga taaaccaacg catagaggaa ttgcgccga accaggccat cagccgcctg 300
 gagggcctga gcaacctgta ccaaatctac gccgagagct tccgcgagtg ggaggccgac 360
 cccaccaacc ccgccctgcg cgaggagatg cgcattccagt tcaacgacat gaacagcgcc 420
 ctgaccaccg ccatccccct gttcgccgtg cagaactacc aggtgccctt gctgagcgtg 480
 tacgtgcagg ccgccaacct gcacctgagc gtgctgcccg acgtcagcgt gttcggccag 540
 cgctggggct tcgacgccgc caccatcaac agccgctaca acgacctgac ccgctgatc 600
 ggcaactaca ccgaccacgc cgtgcccgtg tacaacaccg gcctggagcg cgtgtggggt 660
 cccgacagcc gcgactgat caggtacaac cagttccgcc gcgagctgac cctgaccgtg 720
 ctggacatcg tgagcctgtt ccccaactac gacagccga cctaccccat ccgaccgtg 780
 agccagctga cccgcgagat ttacaccaac cccgtgctgg agaacttcga cggcagcttc 840
 cgcgccagcg ccagggcat cgagggcagc atccgcagcc ccacctgat ggacatcctg 900
 aacagcatca ccatctacac cgacgcccac cgcggcgagt actactggag cggccaccag 960
 atcatggcca gccccgtcgg cttcagcggc ccgagttca ccttccccct gtacggcacg 1020
 atgggcaacg ctgcacctca gcagcgcacg gtggcacagc tgggcccagg agtgtaccgc 1080
 accctgagca gcacctgta ccgtcgacct ttcaacatcg gcatcaaca ccagcagctg 1140
 agcgtgctgg acggcaccga gttcgctac gccaccagca gcaacctgcc cagcgcctg 1200
 taccgcaaga gcggcaccgt ggacagcctg gacgagatcc ccctcagaa caacaacgtg 1260
 ccacctgac agggcttcag ccacctctg agccacgtga gcatgttccg cagtggcttc 1320
 agcaacagca gcgtgagcat catccgtgca cctatgttca gctggattca ccgagtgcc 1380
 gagttaaca acatcatccc cagcagccag atcaccaga tccccctgac caagagcacc 1440
 aacctgggca gcggcaccag cgtggtgaag gccccggct tcaccggcgg cgacatcctg 1500
 cgccgcacca gccccggcca gatcagcacc ctgcccgtga acatcaccgc ccccctgagc 1560
 cagcgtacc gcgtccgat ccgtacgcc agcaccacca acctgcagtt ccacaccagc 1620
 atcgacggcc gcccacatca ccagggcaac ttcagcgcca ccatgagcag cggcagcaac 1680
 ctgcagagcg gcagcttccg caccgtgggc ttaccaccc ccttcaactt cagcaacggc 1740
 agcagcgtgt tcacctgag cccccagtg ttcaacagcg gcaacgaggt gtacatcgac 1800
 cgcacagagt tcgtgcccgc cgaggtgacc ttcgaggccg agtactag 1848

<210> 21

<211> 1002

5

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

ES 2 624 276 T3

<221> terminador

<222> (1)..(1002)

5 <400> 21

```

gcggcttctc ttcactcacc tgcagagtgc accgcaataa tcagcttccg gatgggtggcg      60
ttttgtcagt tttggatgga aatgccgaac tggcagcgtc tgttttccct atgcatatgt      120
aatttcctgc ctctttatat tcactettgt tgtcaagtcc aagtggaaaa tcttggcata      180
ttatacatat tgtaataata aacatcgtac aatctgcatg ctgttttgta ataattaatt      240
aatatcccag cccattggat ggacttgttt accaaggtgt tacttcagtc accctctttt      300
agttgtgcta aacagtttct gattgatatt tttttattag agtaacctag tgcatttact      360
taagagaaat gatatctagt ggcactagtg attagtttgc aaggttgaga acttgttact      420
cgctcctaga ggtaaacact agcaagtgat tggagcttag ggtttttctt gaatttcact      480
agaaaaaata taaactagta tatcatgata tgcacttaag tctttttagt gttatctacc      540
gacactcaaa aaggctttct tgctactcat ttctcttact cctaaagcaa aaaaaaata      600
gccaaatgac cctccctcta acaataatca taatgaaatc tcacctctct tttaggtgca      660
atatttttgt gggagtgggt ctttttgggt gactgagggg ctctaggaag gggatcagta      720
gagatatcta gcaaggtgtc aagtgtattc ctgagatggt taggttttga acaccacaca      780
tgttttctgag gaggggctct cataagctcc ttaggcactc catctctcac aataggggtg      840
gcagatttgg gaggagtgag cttgacatgt ttgggggtga tgaaggttc tctgaaggtt      900
ttaggccact aactcacca acctacca cacaagtgac actcccatcc ttagcagcaa      960
agcctaaccg cgttcccca gttcccctct tgaactaact ga                                1002

```

<210> 22

10 <211> 1001

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

15 <221> terminador

<222> (1)..(1001)

<400> 22

ES 2 624 276 T3

gccatcagtc gttgaagctg ctgctgtatc tgggttatct agtgtctctg ccattgcca 60
 aggatgggtgc tgtctttcaa agtatattgta tggtttgtgt cgtgagtcgt gactgagctg 120
 gtttcatgga ccagttgtgt tctcgttacc caaaactatc gtgcgaccgc atatggctta 180
 atcatgaata aatgttgttt gaatttaaac tattcogctga atattgttgt tttttgtcat 240
 gtcagttaat gttactaaat tggttgcctt ctaatTTTTg tttactggtg tttgtcgcac 300
 cttatctttt tactgtatgt ttacttcagg ttctggcagt ctcatTTTTt gtgactagtt 360
 aaaacttaca gctaaaaaaaa tgcagttttt ctttttcatt tgaagtttga ttagagctat 420
 tgatacccg accatcaggt taggttagtt gtgcatagaa tcataaatat taatcatgtt 480
 ttctatgaat taagtcaaac ttgaaagtct ggctgaatat agtttctatg aatcatattg 540
 atatacatgt ttgattattt gttttgctat tagctattta ctttggtgaa tctatatagg 600
 cttatgcaga acctTTTTtT ttgttctata tatccatc ctagtactca gtagctctat 660
 gttttctgga gactagtggc ttgctttttc gtatgtctaa ttttttgctt gaccattgca 720
 aaacaaaaat tacctagtgt aatctctttt tataataatc ttgtaatgcg tctacctata 780
 ggtcaaagta ggttttgttt ggaaccctta gagctaactg ttagctagtt gataaattat 840
 tagctgagtt aagctagcta atgaactagt tttgatatta gctgaggatg tttgaaacct 900
 aataattatt ttttattagc taactatact aaatTTtagt agagagattc caaacaggag 960
 ttaacatggg atcagattgg ctatgcgttt gcaatcccat a 1001

<210> 23

5 <211> 253

<212> ADN

<213> Agrobacterium tumefaciens

<220>

10 <221> terminador

<222> (1)..(253)

<400> 23

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

15

<210> 24

ES 2 624 276 T3

<211> 1047

<212> ADN

<213> Zea mays

5

<220>

<221> terminador

<222> (1)..(1047)

<400> 24

10

```

gtccatgaca aagtaaaacg tacagagaca cttgataata tctatctatc atctcggaga      60
agacgaccga ccaataaaaa taagccaagt ggaagtgaag cttagctgta tatacaccgt      120
acgtcgtcgt cgtcgttccg gatcgatctc gcccggttag ctagcagaac gtgtacgtag      180
tagtatgtaa tgcattggagt gtggagctac tagctagctg gccgttcatt cgattataat      240
tcttcgctct gctgtggtag cagatgtacc tagtcgatct tgtacgacga agaagctggc      300
tagctagccg tctcgatcgt atatgtactg attaactctgc agattgaata aaaactacag      360
tacgcatatg atgcgtagct acgtgtgtat agtttgtgct catatatgct cctcatcacc      420
tgcctgatct gcccatcgat ctctctcgta ctccctcctg ttaaagcct tctttgacag      480
acacaccacc accagcagca gtgacgctct gcacgccgcc gctttaagac atgtaagata      540
ttttaagagg tataagatac caaggagcac aaatctggag cactgggata ttgcaaagac      600
aaaaaaaaaa caaaattaaa gtcccaccaa agtagagata gtaaagaggt ggatggatta      660
aaattatctc atgatttttg gatctgctca aatagatcga tatggtattc aggtctatgt      720
tgtatagcct tttcattagc tttctgaaaa aaaaatggta tgatgagtgc ggagtagcta      780
gggctgtgaa ggagtcggat gggcttcacac gtacttgttt gtggccctag tccggttcta      840
tttaggtccg atccgagtcc ggcattggtcc ggttcatac gggctaggac caagctcggc      900
acgtgagttt taggcccgtc ggctagcccg agcacgacct gtttttaaac tggctaggac      960
tcgcccattt aataagacaa acattgcaaa aaatagctct attttttatt taaaatatat     1020
tgtttatttg tgaaatgtgt attattt                                     1047

```

<210> 25

15

<211> 1136

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<220>

20

<221> terminador

ES 2 624 276 T3

<222> (1)..(1136)

<400> 25

	tgacatggat atgatgatca gctcatcttc tatactttat gctgttatgc agacagacac	60
	tactgatgtg gctatatata tagtatttgt gtgctgctgc attttgtaa tcccttataa	120
	attgctactt aattatctca tggagaattg gagagaccaa atgggcagag ctagctagtt	180
	agctgtgcc aattaagaag ctaaacttat cagaagtgtg tactgatgag tgatgagtat	240
	ttttcttcat ttgggatcaa attaaactaa gtaaacata tatatttgac ttatgtttta	300
	cgtgcatgca tgcattgctta attgtgtcac ctttggggat tcattttgta catatgtgca	360
	ccattttgtg tgtacaatgc aggtttatat gacttttttc gcaattacac gatgcccac	420
	gcacataacc accatgcaca ctgcacgtac atccacaagt gtgcccttt aacacaaggc	480
	aatacaccaa ataaattgta atgtgccact aaactttttt gaaagtgtaa ccgcgcgtat	540
	gcttccgtgg cttatataatg actctgggtg ctgacttcta gggcatgtcg acctgagcat	600
	cttcgtgtgg gtttcgactc tctaattctc ctggctctcg gcagttgtgg aagggcgaa	660
	actccagggt ttttgattac tctcttctc cactctcaag ggttctgaaa gtcactctac	720
	aggaagaccg tttgtggtct tctgctggcg tcgctgtttt taggggttta ttaggagtgt	780
5	agtggagctt cgccaccacc ctccatctat ttaggagcaa catttttttg gtagttttt	840
	actttagcag tctttttgtt tctttctttg ttcccttacc cacatgcaat ggtcgtctga	900
	ctggttacgt tgtgtaacaa aaactctgct tttttctaata atactgacgt gcaatccttt	960
	gggtgcgttcg cgaaaagaaa gggggatcaa ttgcaagtat tttgtgggaa ttaaactttt	1020
	cttgtgaaat tattgtaaaa ttccagcatt ctaaatagagc tctaatagtgt gataatttgc	1080
	attctctata tatattgaat aattcttttg ttgactagtt gggtgcccgt gcgttg	1136

<210> 26

<211> 1803

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen de sacarosa isomerasa optimizado de maíz

15

<220>

<221> gen

<222> (1)..(1803)

ES 2 624 276 T3

<400> 26

atgcgcgtgc tgetcgtggc cctggccctg ctggetctcg ccgctagcgc cacctcccac	60
agccgcttca acccgatccg cctgcccgacc acccacgagc cagccgtggc cgtgaacgac	120
ggcgtgtccg cccaccagt gtggtggaag gaggccgttt tctaccaggt gtaccgcgcg	180
agcttcaagg acagcgacgg cgacggcatc ggcgacctga agggcctgac cgagaagctg	240
gactacctga aggccttggg catcaacgcc atctggatca acccgacta cgacagcccg	300
aacaccgaca acggctacga tatccgcgac taccgcaaga tcatgaagga atacggcacg	360
atggacgact tcgaccgcct gatcgccgag atgaagaagc gcgacatgcg cctgatgatc	420
gacgtggtgg tgaaccacac cagcgacgag cacgagtggc tcgtggagag caagaagtcc	480
aaggacaacc cgtaccgca ctactacatc tggcgcgacg gcaaggacgg caccagccg	540
aacaactacc cgagcttctt cggcggcagc gcctggcaga aggacaacgc caccagcag	600
tactacctgc actacttcgg cgtccagcag ccggacctga actgggacaa cccgaaagtg	660
agggaggagg tgtacgacat gctgaggttc tggatcgaca agggcgtgtc cggcctgagg	720
atggacaccg tggccacctt cagcaagaac ccggccttcc cggacctgac cccgaagcag	780
ctccagaact tcgcctacac ctacaccag ggcgccgaacc tgcaccgcta catccaggag	840
atgcaccaga aggtcctggc caagtacgac gtggtgtctg ccggcgagat cttcggcgtg	900
ccgctcgagg aggcgctcc gttcatcgac cagcgccgga aggaactgga catggccttc	960
agcttcgacc tgatccgcct cgacagggcc gtggaggaga ggtggcgccg caacgactgg	1020
accctgagcc agttccgcca gatcaacaac cgcttgggtg acatggccgg ccagcagggc	1080
tggaacacgt tcttcctcag caaccacgac aaccggaggg ccgtgtcca cttcggcgac	1140
gacaggccag agtggaggac ccgcagcgcc aaggccctgg ccaccctggc cctgaccag	1200
agggctaccc cattcatcta ccaggcgac gagctgggca tgaccaacta cccgttcacc	1260
agcctgagcg agttcgacga tatcgaggtg aagggttctt ggcaggactt cgtggagact	1320
ggcaaggtga agccagacgt gttcctcgag aacgtgaagc agaccagccg cgacaacagc	1380
cgacccccgt tccagtggag caacaccgcc caggccggct tcaccaccgg cccccgtgg	1440
ttccgcatca accggaacta caagaacatc aacgccgagg agcagacca gaaccgggac	1500
agcatcttcc acttctaccg ccagctgac gagctgagge acgccacccc ggccttcacc	1560
tacggcacct accaggacct ggacccgaac aacaacgagg tgctggccta caccgcgag	1620
ctgaaccagc agcgctacct ggtggtggtc aacttcaagg agaagccggt cactacgtg	1680
ctgcccaga ccctgagcat caagcagagc ctgctcgaga gggccagaa ggacaaggtc	1740
gagccgaacg ccaccaccct cgagcttcag ccctggcaga gggcatcta tcagctgaac	1800
tga	1803

REIVINDICACIONES

1. Un método de expresar transitoriamente una secuencia de nucleótidos en una parte de planta de una monocotiledónea *in planta* que comprende las etapas de:
- 5 a) agro-infiltración de un vector binario que comprende al menos un casete de expresión que comprende al menos una secuencia de nucleótidos operativamente unida a un promotor en una parte de planta de una monocotiledónea *in planta*, en el que la parte de planta es tejido de hoja de una planta que tiene un máximo 25 días de edad;
- b) expresar transitoriamente dicha al menos una secuencia de nucleótidos en la parte de planta;
- 10 en el que dicho vector binario no comprende un virus o vector de virus y en el que se lleva a cabo la infiltración de hojas intactas individuales y en el que dicha agro-infiltración se lleva a cabo usando una jeringa sin aguja.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el estadio de desarrollo de la planta es el estadio de dos hojas o el estadio de tres hojas.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el tejido de hoja de planta joven no tiene más de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días de edad.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que el promotor es un promotor constitutivo o de hoja preferido.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos se expresa transitoriamente durante al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la planta monocotiledónea está seleccionada del grupo que consiste en: maíz, trigo, sorgo, cebada, mijo, avena, caña de azúcar y arroz.
- 20 7. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende agro-infiltración de 0,25 a 2 mililitros de un líquido que comprende el casete de expresión.
8. El método de la reivindicación 1, en el que dicho casete de expresión es mayor de 1,5 kilobases en tamaño.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende agro-infiltración de un vector binario.
- 25 10. El método de la reivindicación 1, en el que la agro-infiltración se lleva a cabo sobre la parte inferior de dicho tejido de hoja de planta joven.
11. Un método de expresar transitoriamente una secuencia de nucleótidos de interés en una parte de planta *in planta* que comprende las etapas de:
- 30 a) agro-infiltración de un vector binario que comprende al menos un casete de expresión que comprende al menos una secuencia de nucleótidos en una parte de planta de una planta de maíz *in planta*, en el que la parte de planta es tejido de hoja de una planta que tiene un máximo 25 días de edad;
- b) expresar transitoriamente dicha al menos una secuencia de nucleótidos en la parte de planta;
- en el que dicho vector binario no comprende un virus o vector de virus.
12. El método de la reivindicación 10, en el que el tejido de hoja de planta joven es tejido de hoja de maíz V2 o V3.