

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 486**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2004 E 10187553 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2308961**

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

30 Prioridad:

25.08.2003 US 497523 P

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

19.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 625 486 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Elementos reguladores de tubulina para su uso en plantas

Campo de la invención

5 La invención está relacionada con el campo de la biología molecular de las plantas e ingeniería genética de las plantas y con moléculas de polinucleótidos que son útiles para la expresión de transgenes en plantas.

Antecedentes

10 Uno de los objetivos de la ingeniería genética de las plantas es producir plantas con características o rasgos deseables desde un punto de vista agronómico. Un medio para lograr este objetivo es la expresión adecuada de un transgén deseable en una planta transgénica. Los elementos reguladores tales como promotores, líderes, e intrones, son moléculas de polinucleótidos no codificantes que desempeñan un papel esencial en la expresión global de genes en células vivas. Por lo tanto, los elementos reguladores aislados que funcionan en plantas son útiles para modificar fenotipos de plantas a través de los procedimientos de ingeniería genética.

15 Muchos elementos reguladores están disponibles y son útiles para proporcionar una expresión global buena de un transgén. Por ejemplo, se sabe que los promotores constitutivos, tales como el P-FMV, el promotor del transcrito 35S del virus del mosaico de la escrofularia (patente de Estados Unidos N.º 6.051.753); el P-CaMV de 35S, el promotor del transcrito de ARN de 35S del virus del mosaico de la coliflor (patente de Estados Unidos N.º 5.530.196); el P-Rice Actin 1, el promotor del gen de actina 1 de *Oryza sativa* (patente de Estados Unidos N.º 5.641.876); y P-NOS, el promotor del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, proporcionan cierto nivel de expresión génica en la mayoría o en todos los tejidos de una planta durante gran parte, o toda, transcrito 35S del virus del mosaico de la escrofularia (patente de Estados Unidos N.º 6.051.753); la vida útil de la planta. Aunque estudios anteriores han proporcionado diversos elementos reguladores útiles que influyen en la expresión génica en plantas transgénicas, aún existe una gran necesidad de elementos reguladores nuevos que tengan características de expresión beneficiosas. Muchos elementos reguladores identificados anteriormente, no proporcionan los patrones o niveles de expresión requeridos para conseguir plenamente los beneficios de expresión de genes seleccionados en plantas de cultivo transgénicas.

20 La organización espacial en la célula eucariota y los movimientos dirigidos del contenido celular están mediados por el citoesqueleto, una red de polímeros proteicos filamentosos que penetra en el citosol. La tubulina es una de las tres familias de proteínas principales que constituyen el citoesqueleto. En casi todas las especies eucariotas se han informado miembros de esta familia multigénica, entre los que se incluyen las levaduras, los seres humanos, el ratón, el género *Drosophila*, el tabaco, el maíz, el arroz, la soja, la patata y el género *Arabidopsis*. En eucariotas superiores existen dos tipos de proteínas de tubulina, la tubulina α y β .

25 Las tubulinas α y β de las plantas están codificadas por dos familias de genes, cada una de ellas constituida por diversos isotipos diferentes.

30 Nuestra hipótesis era que un promotor de un gen de tubulina α podría tener un patrón de expresión constitutivo y que el promotor y los elementos reguladores podrían ser útiles para dirigir la expresión de un transgén tal como un transgén 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) resistente a glifosato para producir una planta tolerante a glifosato. La producción eficiente de las plantas tolerantes a glifosato requiere el uso de un promotor y de elementos reguladores capaces de dirigir la expresión transgénica en todos los tejidos, incluyendo los órganos reproductores más sensibles, tales como las anteras y tejidos meristemáticos. Por tanto, la presente invención proporciona dichos promotores y elementos reguladores aislados de un gen de tubulina α de *Oryza sativa*.

Sumario

35 La invención proporciona moléculas de polinucleótidos aisladas de *Oryza sativa* útiles para modular la expresión transgénica en plantas, en particular

45 (1) una construcción de ADN que comprende una molécula de polinucleótido que tiene actividad génica reguladora y que

(i) comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 2, o
 (ii) consta de una secuencia polinucleotídica con al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de longitud completa de SEQ ID NO: 2 que proporciona expresión en estructuras florales en desarrollo, en la que dicha molécula de polinucleótido aislada está unida operativamente a un transgén de interés;

50 (2) una planta transgénica transformada de forma estable con, y que comprende, una construcción de ADN que comprende una molécula de polinucleótido que tiene actividad génica reguladora y que

(i) comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 2, o

(ii) consta de una secuencia polinucleotídica con al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de longitud completa de SEQ ID NO: 2 que proporciona expresión en estructuras florales en desarrollo,

en la que dicha molécula de polinucleótido está unida operativamente a un transgén de interés;

5 (3) una semilla de dicha planta transgénica del apartado (2) anterior, que comprende la construcción de ADN del apartado (1) anterior;
(4) una molécula de polinucleótido aislada que tiene actividad génica reguladora y que

(i) comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 2, o

10 (ii) consta una secuencia polinucleotídica con al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de longitud completa de SEQ ID NO: 2 que proporciona expresión en estructuras florales en desarrollo; y

(5) un procedimiento para inhibir el crecimiento de malas hierbas en un campo de plantas de cultivo transgénicas tolerantes a glifosato que comprende:

15 (i) plantar las plantas transgénicas transformadas con un casete de expresión que comprende una molécula de polinucleótido que tiene actividad génica reguladora y que comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 2 y que está unido operativamente a una molécula de ADN que codifica un gen de tolerancia a glifosato y

(ii) aplicar el glifosato al campo a un índice de aplicación que inhiba el crecimiento de malas hierbas,

20 en el que el crecimiento y el rendimiento de la planta de cultivo transgénica no se ven sustancialmente afectados por la aplicación de glifosato.

Breve descripción de los dibujos

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

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

Descripción detallada

30 Las siguientes definiciones y procedimientos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos en la materia en la práctica de la presente invención. A menos que se indique lo contrario, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por parte de los expertos en la materia pertinente.

35 La invención desvelada en el presente documento proporciona moléculas de polinucleótidos que tienen actividad génica reguladora de *Oryza sativa*. El diseño, la construcción y el uso de estas moléculas de polinucleótidos son un objeto de la presente invención. Las secuencias polinucleotídicas de estas moléculas de polinucleótidos se proporcionan como SEQ ID NO: 2. Estas moléculas de polinucleótidos son capaces de influir en la transcripción de moléculas de polinucleótidos transcribibles unidas operativamente tanto en tejidos vegetativos como reproductores de plantas y por tanto pueden regular la expresión de transgenes en estos tejidos de forma selectiva.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "molécula de polinucleótido" se refiere a ADN o a ARN mono o bicatenario de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas, respectivamente, leído desde el extremo 5' (cadena arriba) al extremo 3' (cadena abajo).

Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencia polinucleotídica" se refiere a la secuencia de una molécula de polinucleótido. La nomenclatura que se usa para las bases de ADN es la que se expone en el Título 37 del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos §1.822.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "actividad génica reguladora" se refiere a una molécula de polinucleótido capaz de influir en la transcripción o traducción de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. Una molécula de polinucleótido aislada que tiene actividad génica reguladora puede proporcionar una expresión temporal o espacial o modular niveles e índices de expresión de la molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. Una molécula de polinucleótido aislada que tiene actividad génica reguladora puede comprender un promotor, un intrón, un líder, o una región 3' de terminación transcripcional.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a una molécula de polinucleótido que está involucrada en el reconocimiento y en la unión de la ARN polimerasa II y de otras proteínas (factores de transcripción que actúan en trans) para iniciar la transcripción. Un "promotor vegetal" es un promotor nativo o no nativo que es funcional en células vegetales. Un promotor vegetal puede usarse como elemento regulador 5' para

modular la expresión de uno o más genes unidos operativamente. Los promotores vegetales pueden definirse por su patrón de expresión temporal, espacial, o evolutivo.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dominio potenciador" se refiere a un elemento regulador transcripcional que actúa en cis, un elemento cis a.k.a, que confiere un aspecto del control global de la expresión génica. Un dominio potenciador puede funcionar uniendo factores de transcripción, factores proteicos que actúan en trans que regulan la transcripción. Algunos dominios potenciadores se unen a más de un factor de transcripción, y los factores de transcripción pueden interactuar con diferentes afinidades con más de un dominio potenciador. Los dominios potenciadores pueden identificarse mediante diversas técnicas, entre las que se incluye análisis de delección, es decir, deleciónar uno o más nucleótidos del extremo 5' o interior a un promotor; análisis de proteínas de unión a ADN usando obtención de huella (*footprinting*) con DNasa I, interferencia de metilación, ensayos de cambio de la movilidad electroforética, obtención de huella genómica in vivo mediante PCR mediada por ligamiento, y otros ensayos convencionales; o por análisis de similitud de secuencia de ADN con motivos conocidos de elementos en cis mediante procedimientos de comparación de secuencias de ADN. La estructura refinada de un dominio potenciador puede estudiarse adicionalmente mediante mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o mediante otros procedimientos convencionales. Los dominios potenciadores pueden obtenerse mediante síntesis química o aislamiento de promotores que incluyen dichos elementos, y pueden sintetizarse con nucleótidos flanqueantes adicionales que contengan sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar la manipulación de las subsecuencias. Por lo tanto, en el presente documento se describe el diseño, la construcción y el uso de dominios potenciadores de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento, para modular la expresión de moléculas de polinucleótidos unidas operativamente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "quimérico" se refiere al producto de la fusión de porciones de dos o más moléculas de polinucleótidos diferentes. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "promotor quimérico" se refiere a un promotor producido mediante la manipulación de promotores conocidos u otras moléculas de polinucleótidos. Dichos promotores quiméricos pueden combinar dominios potenciadores que pueden conferir o modular la expresión génica de uno o más promotores, por ejemplo, fusionando un dominio potenciador heterólogo de un primer promotor a un segundo promotor con sus propios elementos reguladores parciales o completos. Por lo tanto, en el presente documento se describe, el diseño, la construcción y el uso de promotores quiméricos de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento para modular la expresión de moléculas de polinucleótidos unidas operativamente.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se refiere al porcentaje de nucleótidos idénticos en una secuencia polinucleotídica lineal de una molécula de polinucleótido de referencia (o su cadena complementaria) en comparación con una molécula de polinucleótido de prueba (o su cadena complementaria) cuando las dos secuencias están alineadas de forma óptima (con inserciones, deleciones o huecos nucleotídicos apropiados, con un total inferior al 20 por ciento de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación). Los expertos en la materia conocen bien el alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación y puede realizarse con herramientas tales como el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, y preferentemente mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos tales como GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA disponible como parte del GCG® Wisconsin Package® (Accelrys Inc., Burlington, MA). Una "fracción de identidad" para segmentos alineados de una secuencia de prueba y una secuencia de referencia es el número de componentes idénticos que son compartidos por las dos secuencias alineadas dividido entre el número total de componentes en el segmento de secuencia de referencia, es decir, la secuencia de referencia completa o una parte más pequeña definida de la secuencia. El porcentaje de identidad de secuencia se representa como la fracción de identidad multiplicada por 100. La comparación de las secuencias polinucleotídicas es con una secuencia polinucleotídica de longitud completa.

Por lo tanto, un aspecto descrito en el presente documento es una molécula de polinucleótido que tiene al menos el 98 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia polinucleotídica descrita en el presente documento. También se contemplan moléculas de polinucleótidos que son capaces de regular la transcripción de moléculas de polinucleótidos transcribibles unidas operativamente y que tienen un porcentaje de identidad de secuencia sustancial con las secuencias polinucleotídicas de las moléculas de polinucleótidos descritas en el presente documento.

Procedimientos de aislamiento y modificación de un de promotores

Para aislar fragmentos de un promotor desvelado en el presente documento pueden utilizarse diversos procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, utilizando información de secuencias disponible de forma pública, puede utilizarse tecnología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar regiones flanqueantes de una genoteca de una planta. Los expertos en la materia conocen diversos procedimientos para amplificar moléculas de polinucleótidos desconocidas adyacentes a una región núcleo de una secuencia polinucleotídica conocida. Como procedimientos se incluyen, pero sin limitación, estrategias de PCR inversa (PCRI), PCR vectorial, PCR en forma de Y y paseo genómico. También pueden obtenerse fragmentos polinucleotídicos mediante otras técnicas tales como la sintetización directa del fragmento por medios químicos, como habitualmente se realiza utilizando un sintetizador de oligonucleótidos automático. Para la presente invención, las moléculas de polinucleótidos se aislaron de ADN genómico diseñando cebadores de PCR basándose en

información de secuencias disponible.

5 Los nuevos promotores quiméricos pueden diseñarse o modificarse por ingeniería genética mediante diversos procedimientos. Por ejemplo, un promotor quimérico puede producirse fusionando un dominio potenciador de un primer promotor a un segundo promotor. El promotor quimérico resultante puede tener nuevas propiedades de expresión relativas al primer o segundo promotor. Los nuevos promotores quiméricos pueden construirse de tal forma que el dominio potenciador de un primer promotor se fusiona en el extremo 5', en el extremo 3', o en cualquier posición interna al segundo promotor. La ubicación de la fusión del dominio potenciador al segundo promotor puede ocasionar que el promotor quimérico resultante tenga nuevas propiedades de expresión relativas a una fusión realizada en una ubicación diferente.

10 Los expertos en la materia están familiarizados con los recursos materiales convencionales que describen las condiciones y procedimientos específicos para la construcción, manipulación, y aislamiento de macromoléculas (por ejemplo, moléculas de polinucleótidos, plásmidos), así como la generación de organismos recombinantes y la exploración y el aislamiento de moléculas de polinucleótidos.

Construcciones

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "construcción" se refiere a cualquier molécula de polinucleótido recombinante tal como un plásmido, un cósmido, un virus, una molécula de polinucleótido replicante autónomamente, un fago, una molécula de polinucleótido de ADN o ARN mono o bicatenaria, lineal o circular, procedente de cualquier fuente, capaz de integrarse genómicamente o replicarse autónomamente, que comprende una molécula de polinucleótido en la que una o más moléculas de polinucleótidos se han unido operativamente.

20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "unido(a) operativamente" se refiere a una primera molécula de polinucleótido, tal como un promotor, conectado con una segunda molécula de polinucleótido transcribible, tal como un gen de interés, en el que las moléculas de polinucleótidos están dispuestas de tal modo que la primera molécula de polinucleótido influye en la función de la segunda molécula de polinucleótido. Las dos moléculas de polinucleótidos pueden ser parte de una sola molécula de polinucleótido contigua y pueden ser adyacentes. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a un gen de interés si el promotor regula o media la transcripción del gen de interés en una célula.

30 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de polinucleótido transcribible" se refiere a cualquier molécula de polinucleótido capaz de transcribirse en una molécula de ARN. Se conocen procedimientos para introducir construcciones en una célula de tal forma que la molécula de polinucleótido transcribible se transcribe en una molécula ARNm funcional que se traduce y por tanto se expresa como un producto proteico. Las construcciones también pueden construirse para ser capaces de expresar moléculas de ARN antisentido, con el fin de inhibir la traducción de una molécula de ARN de interés específica. Para la práctica de la presente invención, las composiciones y los procedimientos convencionales para preparar y usar construcciones y células hospedadoras, son bien conocidos para un experto en la materia, véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, volúmenes 1,2 y 3 (2000) J.F. Sambrook, D. W. Russell, y N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

40 Las construcciones de la presente invención contendrían típicamente un promotor unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente a una molécula de polinucleótido de terminación transcripcional 3'. Asimismo, las construcciones pueden incluir, pero sin limitación, moléculas de polinucleótidos reguladoras adicionales de la región 3' no traducida (3' UTR) de genes de plantas (por ejemplo, una 3' UTR para aumentar la estabilidad ARNm del ARNm, tal como la región de terminación PI-II de la patata o las regiones de terminación 3' de la octopina o nopalina sintasa). Las construcciones pueden incluir, pero sin limitación, las regiones 5' no traducidas (5' UTR) de una molécula de polinucleótido de ARNm que puede desempeñar un papel importante en el inicio de la traducción y también puede ser un componente genético en una construcción de la expresión de una planta. Por ejemplo, las moléculas de polinucleótidos líder 5' no traducidas procedentes de genes de proteínas de choque térmico, han demostrado potenciar la expresión génica en plantas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.659.122 y la patente de Estados Unidos N.º 5.362.865).

Estas moléculas de polinucleótidos reguladoras adicionales cadena arriba y cadena abajo pueden proceder de una fuente que es nativa o heteróloga con respecto a los otros elementos presentes en la construcción del promotor.

50 Por lo tanto, un promotor, tal como el que se proporciona en SEQ ID NO: 1-2, está unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible para dirigir la transcripción de dicha molécula de polinucleótido transcribible a un nivel deseado o en un tejido deseado o un patrón de desarrollo después de la introducción de dicha construcción en una célula vegetal. En algunos casos, la molécula de polinucleótido transcribible comprende una región de un gen que codifica una proteína, y el promotor proporciona la transcripción de una molécula de ARNm funcional que está traducida y expresada como un producto de proteína. Las construcciones también pueden construirse para la transcripción de moléculas de ARN antisentido u otros ARN inhibidores similares, para inhibir la expresión de una molécula de ARN de interés específica en una célula hospedadora diana.

Entre los ejemplos de moléculas de polinucleótidos transcribibles para la incorporación en construcciones de la presente invención se incluyen, por ejemplo, moléculas de polinucleótidos o genes de una especie distinta de la

especie del gen diana, o incluso genes que se originan con la misma especie o que están presentes en ella, pero que se incorporan en células receptoras mediante procedimientos de ingeniería genética en lugar de con técnicas clásicas de reproducción o cultivo. Se entiende que un gen o elemento genético exógeno se refiere a cualquier gen o molécula de polinucleótido que se introduce en una célula receptora. El tipo de molécula de polinucleótido incluido en la molécula de polinucleótido exógena puede incluir una molécula de polinucleótido que ya está presente en la célula vegetal, una molécula de polinucleótido de otra planta, una molécula de polinucleótido de un organismo diferente, o una molécula de polinucleótido generada externamente, tal como una molécula de polinucleótido que contenga un mensaje antisentido de un gen, o una molécula de polinucleótido que codifique una versión artificial o modificada de un gen.

Los promotores de la presente invención pueden incorporarse en una construcción usando genes marcadores como se describe y prueba en análisis transitorios que proporcionan un indicio de expresión génica en sistemas vegetales estables. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "gen marcador" se refiere a cualquier molécula de polinucleótido transcribible cuya expresión puede explorarse o puntuarse de algún modo. Los procedimientos de ensayo para la expresión de genes marcadores en ensayos transitorios son conocidos por los expertos en la materia. La expresión transitoria de genes marcadores se ha descrito usando una variedad de plantas, de tejidos, y de sistemas de suministro de ADN. Por ejemplo, como tipos de análisis transitorios pueden incluirse, pero sin limitación, el suministro directo de genes por electroporación o bombardeo de partículas de tejidos en cualquier ensayo de planta transitorio usando cualquier especie vegetal de interés. Dichos sistemas transitorios incluirían, pero sin limitación, la electroporación de protoplastos procedentes de una variedad de fuentes de tejidos o el bombardeo de partículas de tejidos específicos de interés. En el presente documento se describe el uso de cualquier sistema de expresión transitorio para evaluar promotores o fragmentos de promotor unidos operativamente a cualquier molécula de polinucleótido transcribible, entre los que se incluye, pero sin limitación, genes indicadores seleccionados, genes marcadores, o genes de interés agronómico.

Como ejemplos de tejidos vegetales contemplados para probarse en ensayos transitorios mediante un sistema de suministro adecuado, se incluirían, pero sin limitación, tejidos de base foliar, callos, cotiledones, raíces, endospermo, embriones, tejido floral, polen, y tejido epidérmico.

En un ensayo transitorio puede usarse cualquier gen marcador puntuable o explorable. Como ejemplos de genes marcadores para análisis transitorios de los promotores o fragmentos de promotores en la presente invención se incluyen un gen GUS (patente de Estados Unidos N.º 5.599.670) o un gen GFP (patentes de Estados Unidos N.º 5.491.084 y 6.146.826).

Las construcciones que contienen los promotores o fragmentos de promotores unidos operativamente a un gen marcador se suministran a los tejidos y los tejidos se analizan mediante el procedimiento adecuado, dependiendo del marcador. Los análisis cuantitativos o cualitativos se usan como herramienta para evaluar el posible perfil de expresión de los promotores o fragmentos de promotores cuando están unidos operativamente a genes de interés agronómico en plantas estables.

Por lo tanto, en una realización preferida, una molécula de polinucleótido de la presente invención, como se muestra en SEQ ID NO: 2, se incorpora en una construcción, de tal forma que un promotor de la presente invención está unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible que proporciona un marcador seleccionable, explorable, o puntuable. Como marcadores para su uso en la práctica de la presente invención se incluyen, pero sin limitación, moléculas de polinucleótidos transcribibles que codifican \square glucuronidasa (GUS), proteína verde fluorescente (GFP), luciferasa (LUC), proteínas que confieren resistencia a antibióticos, o proteínas que confieren tolerancia a herbicidas. En la técnica se conocen marcadores útiles de resistencia a antibióticos, incluyendo aquellos genes que codifican proteínas que confieren resistencia a kanamicina (nptII), higromicina B (aph IV), estreptomycin o espectinomycin (aad, espec/estrep) y gentamicina (aac3 y aacC4). Como herbicidas para los que se ha demostrado la tolerancia de una planta transgénica y que pueden aplicarse en el procedimiento descrito en el presente documento, se incluyen, glifosato, glufosinato, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinil, delapón, ciclohexanodiona, inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa, y herbicidas de isoxaflutol. En la técnica se conocen moléculas de polinucleótidos que codifican proteínas involucradas en la tolerancia a herbicidas, e incluyen una molécula de polinucleótido que codifica la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), descrita en la patente de Estados Unidos N.º 5.627.061, en la patente de Estados Unidos N.º 5.633.435, y en la patente de Estados Unidos N.º 6.040.497 y aroA descrita en la patente de Estados Unidos N.º 5.094.945 para la tolerancia a glifosato, una molécula de polinucleótido que codifica una bromoxinil nitrilasa (Bxn) descrita en la patente de Estados Unidos N.º 4.810.648 para la tolerancia a Bromoxinil, una molécula de polinucleótido que codifica la fitoeno desaturasa (crtl) descrita en Misawa y col., (1993) Plant Journal 4:833-840 y Misawa y col., (1994) Plant Journal 6:481-489 para la tolerancia a norflurazón; una molécula de polinucleótido que codifica una aceto hidroxiaácido sintasa (AHAS, aka ALS) descrita en Sathasiivan y col. (1990) Polynucleotides Research 18:2188-2193 para la tolerancia a herbicidas de sulfonilurea; y el gen bar descrito en DeBlock, y col., (1987) EMBO Journal 6:2513-2519 para la tolerancia a glufosinato y bialafos.

En una realización de la invención, una molécula de polinucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 2, se incorpora en una construcción, de tal forma que una molécula de polinucleótido de la presente invención, está unida operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible que es un gen de interés agronómico. Tal como se

usa en el presente documento, la expresión "gen de interés agronómico" se refiere a una molécula de polinucleótido transcribible que incluye, pero sin limitación, un gen que proporciona una característica deseable asociada a la morfología, fisiología, crecimiento y desarrollo, rendimiento, mejora nutricional, resistencia a enfermedades o a plagas, o tolerancia ambiental o química de la planta. La expresión de un gen de interés agronómico es deseable para conferir un rasgo importante desde el punto de vista agronómico. Un gen de interés agronómico, que proporciona un rasgo agronómico beneficioso a las plantas de cultivo puede ser, por ejemplo, la inclusión de elementos genéticos que comprenden resistencia a herbicidas (patentes de Estados Unidos N.º 5.633.435 y 5.463.175), rendimiento aumentado (patente de Estados Unidos N.º 5.716.837), control de insectos (patentes de Estados Unidos N.º 6.063.597; 6.063.756; 6.093.695; 5.942.664; y 6.110.464), resistencia a enfermedades fúngicas (patentes de Estados Unidos N.º 5.516.671; 5.773.696; 6.121.436; 6.316.407, y 6.506.962), resistencia a virus (patentes de Estados Unidos N.º 5.304.730 y 6.013.864), resistencia a nematodos (patente de Estados Unidos N.º 6.228.992), resistencia a enfermedades bacterianas (patente de Estados Unidos N.º 5.516.671), producción de almidón (patentes de Estados Unidos N.º 5.750.876 y 6.476.295), producción de aceites modificados (patente de Estados Unidos N.º 6.444.876), producción de aceite superior (patentes de Estados Unidos N.º 5.608.149 y 6.476.295), contenido de ácido graso modificado (patente de Estados Unidos N.º 6.537.750), producción elevada de proteínas (patente de Estados Unidos N.º 6.380.466), maduración de frutos (patente de Estados Unidos N.º 5.512.466), nutrición mejorada de animales y seres humanos (patentes de Estados Unidos N.º 5.985.605 y 6.171.640), biopolímeros (patente de Estados Unidos N.º 5.958.745 y publicación de patente de Estados Unidos N.º US20030028917), resistencia al estrés ambiental (patente de Estados Unidos N.º 6.072.103), péptidos farmacéuticos (patente de Estados Unidos N.º 6.080.560), rasgos de procesamiento mejorados (Patente de Estados Unidos N.º 6.476.295), digestibilidad mejorada (patente de Estados Unidos N.º 6.531.648) rafinosa inferior (patente de Estados Unidos N.º 6.166.292), producción de enzima industrial (patente de Estados Unidos N.º 5.543.576), sabor mejorado (patente de Estados Unidos N.º 6.011.199), fijación de nitrógeno (patente de Estados Unidos N.º 5.229.114), producción de semillas híbridas (patente de Estados Unidos N.º 5.689.041), y producción de biocombustible (patente de Estados Unidos N.º 5.998.700).

Como alternativa, una molécula de polinucleótido transcribible puede efectuar los fenotipos anteriormente mencionados codificando una molécula de ARN que cause la inhibición de expresión dirigida de un gen endógeno, por ejemplo, mediante mecanismos mediados por ARN antisentido, inhibidor (ARNi), o cosupresión. El ARN también puede ser una molécula de ARN catalítica (por ejemplo, una ribozima) diseñada genéticamente para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. Por lo tanto, cualquier molécula de polinucleótido que codifique una proteína o un ARNm que exprese un cambio de fenotipo o de morfología de interés, puede ser útil para la práctica de la presente invención.

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

45 **Plantas transformadas y células de plantas**

Tal como se usa en el presente documento, El término "transformado" se refiere a una célula, tejido, órgano, u organismo en el que se ha introducido una molécula de polinucleótido exógena, tal como una construcción. La molécula de polinucleótido que se ha introducido puede integrarse en el ADN genómico de la célula, tejido, órgano, u organismo receptor, de tal manera que la descendencia posterior heredará la molécula de polinucleótido que se ha introducido. Una célula u organismo "transgénico" o "transformado" también incluye la descendencia de la célula u organismo y descendencia producida por un programa de cultivo que emplea dicha planta transgénica como un progenitor en un cruzamiento y que muestra un fenotipo alterado resultante de la presencia de una molécula de polinucleótido exógena. En las plantas puede introducirse una construcción de transformación de plantas que contenga un promotor de la presente invención mediante cualquier procedimiento de transformación de plantas. Como procedimientos y materiales de transformación de plantas introduciendo una construcción de expresión de plantas en un genoma de planta, pueden incluirse cualquiera de los procedimientos bien conocidos y demostrados entre los que se incluye, electroporación, como se ilustra en la patente de Estados Unidos N.º 5.384.253; bombardeo con microproyectiles, como se ilustra en las patentes de Estados Unidos N.º 5.015.580; 5.550.318; 5.538.880; 6.160.208; 6.399.861; y 6.403.865; transformación mediada por *Agrobacterium*, como se ilustra en las patentes de Estados Unidos N.º 5.824.877; 5.591.616; 5.981.840; y 6.384.301; y transformación con protoplastos, como se ilustra en las patentes de Estados Unidos N.º 5.508.184.

Los expertos en la materia conocen bien procedimientos para transformar específicamente plantas dicotiledóneas.

La transformación y regeneración de plantas usando estos procedimientos se han descrito para diversos cultivos entre los que se incluye el algodón (*Gossypium hirsutum*), la soja (*Glycine max*), el cacahuate (*Arachis hypogaea*), y miembros del género Brassica.

5 Los expertos en la materia conocen bien procedimientos para transformar específicamente plantas monocotiledóneas. La transformación y regeneración de plantas usando estos procedimientos se han descrito para diversos cultivos entre los que se incluye, pero sin limitación, la cebada (*Hordeum vulgare*); el maíz (*Zea mays*); la avena (*Avena sativa*); el pasto ovillo (*Dactylis glomerata*); el arroz (*Oryza sativa*, incluyendo las variedades indica y japónica); el sorgo (*Sorghum bicolor*); la caña de azúcar (*Saccharum sp*); la festuca talluda (*Festuca arundinacea*); especies de césped (por ejemplo, las especies: *Agrostis stolonifera*, *Poa pratensis*, *Stenotaphrum secundatum*); el trigo (*Triticum aestivum*), y la alfalfa (*Medicago sativa*). Para los expertos en la materia es obvio que pueden usarse y modificarse diversas metodologías de transformación para la producción de plantas transgénicas estables a partir de cualquiera de los diversos cultivos diana de interés.

15 Las plantas transformadas se analizan con respecto a la presencia de genes de interés y al nivel de expresión y/o perfil conferido por los promotores de la presente invención. Los expertos en la materia son conscientes de los numerosos procedimientos disponibles para el análisis de plantas transformadas. Por ejemplo, entre los procedimientos para el análisis de plantas se incluye la transferencia de Southern y la transferencia Northern, estrategias basadas en la PCR, análisis bioquímicos, procedimientos de exploración fenotípica, evaluaciones de campo, y ensayos inmunodiagnósticos.

20 Las semillas de la presente invención pueden cosecharse de plantas transgénicas fértiles y usarse para cultivar generaciones progenitoras de plantas transformadas de la presente invención, entre las que se incluye líneas vegetales híbridas que comprenden la construcción de la presente invención y que expresan un gen de interés agronómico.

25 También se proporcionan partes de las plantas descritas en el presente documento. Entre las partes de la planta se incluye la semilla, el endospermo, el óvulo y el polen. En una realización de la presente invención, la parte de la planta es una semilla.

Otro aspecto más de la invención es un procedimiento de inhibición del crecimiento de malas hierbas en un campo de plantas de cultivo transgénicas, que comprende una primera plantación de plantas transgénicas transformadas con un casete de expresión que comprende una molécula de polinucleótido que tiene actividad génica reguladora y que comprende una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 2 y que está unida operativamente a una molécula de ADN que codifica un gen de tolerancia a glifosato y a continuación la aplicación de glifosato al campo a un índice de aplicación que inhiba el crecimiento de las malas hierbas, en el que el crecimiento y el rendimiento de la planta de cultivo transgénica no se ven sustancialmente afectados por la aplicación de glifosato. El índice de aplicación de glifosato es el índice efectivo necesario para controlar las malas hierbas en un cultivo tolerante a glifosato particular; estos índices pueden variar de 0,56 a 17,93 kg/ha (8 a 256 onzas/acre), preferentemente de 1,12 a 8,97 kg/ha (16 a 128 onzas/acre), y de forma más preferente de 2,24 a 6,72 kg/ha (32 a 96 onzas/acre). El glifosato se aplica al menos una vez durante el crecimiento del cultivo tolerante a glifosato y puede aplicarse 2, 3, o 4 veces durante el crecimiento del cultivo o más veces si fuese necesario para controlar las malas hierbas en el campo. Los ejemplos no cubiertos por el alcance de las reivindicaciones se presentan a título ilustrativo.

Ejemplos

40 **Ejemplo 1: Identificación de genes constitutivos**

Se identificaron genes de arroz que tenían un patrón de expresión constitutivo como la primera fase en el aislamiento de elementos heterólogos para su uso en la construcción de casetes transgénicos. Los genes que participan en funciones celulares básicas, tales como la formación del citoesqueleto, a menudo se expresan de manera constitutiva en toda la planta. Sin embargo, estos genes a menudo existen en familias de genes, y aunque la expresión global de los miembros de la familia pueda ser constitutiva en toda la planta, los miembros individuales pueden tener patrones de expresión específicos más restringidos, temporales, de desarrollo, o de tipo de órgano/tejido/célula. En este sentido, familias de genes específicas se centraron en la selección de genes candidatos individuales usando datos de estudios de expresión de genes.

50 Usando una secuencia genómica de arroz se identificaron las secuencias de la región no traducida (UTR) 5' de miembros de familias multigénicas seleccionadas (entre las que se incluía la tubulina, la actina, la histona, etc.). Se diseñaron cebadores para hibridarse con las secuencias de la UTR 5' y la PCR se realizó usando procedimientos convencionales. Los productos de molécula de polinucleótido posteriores se dispusieron en filtros de nilón para el análisis de expresión de ARNm. Después, los filtros se analizaron con moléculas de ADNc procedentes de acumulaciones de ARNm de tejido de raíz, hoja, grano, antera, ovario, o gluma. El experimento se repitió dos veces y los resultados se usaron para analizar la expresión de los genes seleccionados. A partir del análisis de los datos de expresión, se seleccionaron veinte genes para un análisis adicional utilizando PCR en tiempo real con cebadores específicos de la UTR 3'. Los cebadores se usaron junto con el kit SYBR Green (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA) utilizando un aparato Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA) y protocolos convencionales suministrados por

5 el fabricante para amplificar las secuencias fuera del ADNc de la hoja, raíz, antera, gineceo, o ápice. A continuación los resultados se compararon con el nivel de expresión para el gen de la actina 1 de arroz, cuyo promotor y primer intrón se sabe que proporcionan alta tolerancia a glifosato cuando está unido operativamente a un gen EPSPS resistente a glifosato. Se mostró que un gen de tubulina α , denominado Os-TubA-3, se expresaba en todos los tejidos del arroz a niveles más altos que los del gen ract1.

10 El patrón de expresión generalmente constitutivo del gen Os-TubA-3 se confirmó adicionalmente cuando se realizó un análisis con BLASTN usando su secuencia UTR 3' como una búsqueda de genotecas de EST de arroz preparadas a partir de diversos órganos de arroz a varias fases de desarrollo (véase la Tabla 1). Los resultados se compararon de nuevo con el nivel de expresión para el gen de la actina 1 de arroz. Un rasgo de expresión particularmente deseable del gen TubA-3 fue la representación de EST en estructuras florales en desarrollo, incluyendo las anteras. Se realizó una búsqueda con BLASTN usando la secuencia UTR 3' de Os-TubA-3 para identificar un BAC de arroz que contuviese una copia genómica completa del gen Os-TubA-3 incluyendo la región del promotor.

Tabla 1: Aparición de secuencias UTR 3' respectivas en genotecas de EST de arroz.

Genoteca	Número total de lecturas 5' y 3'	Apariciones de actina 1 de arroz	Apariciones de Os-TubA-3
panícula, rotura- 3/4 apertura de la flor	20.227	7	>16
desarrollo de la panícula	7.909	5	>16
última antera	5.956	14	4
desarrollo de la semilla	7.453	1	8
semilla seca	9.362	0	0
semilla germinada	9.743	0	1
ápice vegetativo	7.672	2	>16
hoja, hoja 3-5	10.040	0	1
hoja, brote 3-4	9.209	1	0
hoja, elongación del pasador	7.897	1	3
raíz, hoja 3-5	10.524	2	4
raíz, brote 3-4	10.624	1	9
raíz, tercer brote lechoso	7.481	1	3

Ejemplo 2: Construcciones

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

30 A continuación se crearon construcciones para la caracterización en planta del promotor Os-TubA-3 para la expresión de un transgén unido operativamente. El promotor se ligó a una construcción de expresión de planta de tal manera que el promotor estaba unido operativamente al transgén de interés.

La región 3' de Os-TubA-3 (500-600 pb de secuencia inmediatamente cadena abajo del codón de terminación de la

traducción que incluía la secuencia cadena abajo adyacente más la UTR 3') también se amplificó usando oligonucleótidos OsTUBA136-5 y OsTUBA136-6 (proporcionados como SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11). La secuencia de la región 3' se proporciona como SEQ ID NO: 3. La región 3' se usó en la construcción del vector de transformación de la planta para proporcionar mayor diversidad de elementos sobre las construcciones existentes para capturar cualquier capacidad reguladora (transcripcional o al nivel de estabilidad del ARNm) presente en la secuencia. La región 3' de Os-TubA-3 se ligó al extremo 3' del transgén de interés. Para la caracterización de la actividad GUS el vector de transformación de la planta pMON77978 como se muestra en la figura 1 contiene el gen indicador GUS como el transgén de interés. Para la caracterización de la tolerancia a glifosato el vector de transformación de la planta pMON70453 como se muestra en la figura 2 contiene el gen CTP2/CP4 EPSPS como el transgén de interés.

Ejemplo 3: Caracterización de promotores en sistemas transitorios

Se usó el vector de expresión de planta pMON77978 para transformar callos de maíz usando bombardeo de partículas para la caracterización del promotor de la planta. La actividad GUS se analizó después cuantitativamente. Los resultados se muestran en la Tabla 2. El promotor Os-TubA-3 demostró tener un nivel de expresión deseable en este sistema transitorio.

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

Construcción	Actividad GUS (pmoles/proteína µg/hora)
Os-TubA-3 (pMON77978)	17,51 ± 2,16
E35S (pMON77952)	33,53 ± 11,28
Control en blanco de vector GUS sin promotor (pMON77951)	1,67 ± 0,502

Ejemplo 4: Caracterización de promotores en plantas transgénicas

Se usó el vector de expresión de planta pMON70453 para transformar maíz usando un procedimiento de transformación mediado por Agrobacterium. Por ejemplo, se usó una cepa desarmada de Agrobacterium C58 que llevaba una construcción de ADN binario de la presente invención. La construcción de ADN se transfirió a un Agrobacterium mediante un procedimiento de apareamiento triparental (Ditta y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 77:7347-7351,1980). Se iniciaron cultivos líquidos de Agrobacterium a partir de reservas de glicerol o de una placa recién sembrada en estrías y cultivada durante toda la noche a 26-28 °C con agitación (aproximadamente 150 rpm) hasta una fase de crecimiento semilogarítmica en medio LB líquido, a pH 7,0 que contenía los antibióticos apropiados. Las células de Agrobacterium se resuspendieron en el medio de inoculación (líquido CM4C) y la densidad se ajustó a una DO₆₆₀ de 1. Se inocularon embriones de maíz inmaduro HillxLH198 y Hill de tipo II recién aislados con Agrobacterium que contenía una construcción y se cocultivó durante varios días en la oscuridad a 23 °C. A continuación los embriones se transfirieron a medios de retardo y se incubaron a 28 °C durante varios días o más. Todos los cultivos posteriores se mantuvieron a esta temperatura. Los embriones se transfirieron a un primer medio de selección que contenía carbenicilina 500/ glifosato 0,5 mM. Dos semanas después, el tejido que sobrevive se transfirió a un segundo medio de selección que contenía carbenicilina 500 y glifosato 1,0 mM. El callo sobrevive en subcultivo cada 2 semanas hasta que pueden identificarse sucesos. Esto puede llevar aproximadamente 3 subcultivos en glifosato 1,0 mM. Una vez identificado los sucesos, el tejido se hace crecer hasta regenerarse. Las plántulas (sucesos) se transfieren a un medio MSOD en un recipiente de cultivo y se conservan durante dos semanas. La eficacia de la transformación se determina dividiendo el número de sucesos producidos entre el número de embriones inoculados. A continuación, las plantas con raíz se transfieren al suelo. Los expertos en la materia de procedimientos de transformación de monocotiledóneas pueden modificar este procedimiento para proporcionar plantas monocotiledóneas transgénicas sustancialmente idénticas que contengan las composiciones de ADN de la presente invención, o usar otros procedimientos, tales como pistola de partículas, que se sabe que proporcionan plantas monocotiledóneas transgénicas.

Se generaron aproximadamente 25 sucesos por construcción. Los sucesos se seleccionaron en un medio que contenía glifosato, se transfirieron al suelo, y a continuación se trasladaron al invernadero. En el invernadero, las plantas se pulverizaron con glifosato (glifosato 0,84 kg de equivalente de ácido por ha⁻¹) usando la formulación Roundup Ultra en la fase de hoja V4 aproximadamente. Las plantas que sobrevivieron sin ningún tipo de lesión (< 10 % de clorosis y malformación) se guardaron y transfirieron a macetas grandes. En la fase V8 aproximadamente, se realizó una segunda aplicación de glifosato como anteriormente. Esta segunda pulverización se realizó para evaluar la tolerancia reproductora masculina. Se puntuaron los sucesos de las nuevas construcciones para la fertilidad masculina tras la maduración de las panículas. La calificación de fertilidad masculina (MFR) se puntuó en un intervalo en el que MFR=1 es completamente estéril (para panículas que no tengan flores desarrolladas) y MFR=5 contiene mucho desprendimiento de polen (para anteras completamente desarrolladas con desprendimiento de polen); Una MFR=4-5 se considera comercialmente viable. Se usó una combinación de análisis Taqman y Southern para evaluar el número de copias transgénicas en los sucesos que ocurrían en el invernadero. El análisis Southern

usando los nuevos elementos también demostró que estas secuencias heterólogas no manifestaban hibridación cruzada en secuencias de maíz endógenas - una calidad significativa para la caracterización de sucesos. Estas evaluaciones tempranas forman parte de un procedimiento para seleccionar casetes equivalentes a P-Os.Act1/CP4. Entre los criterios importantes para realizar una construcción satisfactoria se incluyen una eficacia de transformación buena (número de sucesos producidos/nº de explantes inoculados) y la habilidad de proporcionar de manera reproducible transformantes tolerantes de forma vegetativa y reproductiva que lleven una única copia del transgén. En la Tabla 3 se muestra un resumen de las evaluaciones de la transformación temprana y en invernadero. Los sucesos de copia única que aprobaron las evaluaciones en invernadero se adelantaron a las evaluaciones en campo.

Tabla 3: Evaluaciones de transformación temprana e invernadero.

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

Las evaluaciones de campo se realizaron en Puerto Rico con plantas de maíz de generación F2. Las plantas se trataron con dos aplicaciones de glifosato 3,36 kg de equivalente ácido por ha⁻¹) en una formulación Roundup UltraMax™ (4X por encima de la tasa real de uso en campo). Se realizó un tratamiento en la etapa V4 y un segundo tratamiento en la etapa V8. Las calificaciones vegetativas para la clorosis (<10% clorosis) y la malformación (<10% malformación) se tomaron 10 días después del tratamiento. Las calificaciones de fertilidad masculina (MFR) se tomaron en la maduración de la panícula. Para comparar, se evaluó un suceso comercial NK603 (pMON25496 que contenía P-Os.Act1/CP4 EP- SPS::P-e35S/CP4 EPSPS). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Evaluación de campo.

Construcción	Número de sucesos	Sucesos que aprobaron la calificación de malformación V8	Sucesos que aprobaron la calificación de clorosis V8	Sucesos que aprobaron las calificaciones vegetativas y MFR = 4-5
P- Os.Act1+E35S NK603	1	1	1	1
P-Os.TubA-3 pMON70453	7	6	6	6

La acumulación de proteína CP4 EPSPS (µg/mg de proteína total mostrada como media ± error estándar) en varios tejidos de maíz se midió después para sucesos de copia única en plantas F1 hemicigotas que mostraron una eficacia de campo buena para la tolerancia a glifosato. Para comparar, el suceso NK603 tiene aproximadamente 21 ppm o aproximadamente 1,4 µg CP4 EPSPS/mg de proteína total en la fase de la lámina de hoja V4 cuando se cultivó en condiciones similares. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Monsanto Technology, LLC

<120> Moléculas promotoras para su uso en plantas

<130> 38-21(53419)A

<150> EP 04786581.1

<151> 25-08-2004

5

<150> US 60/497523

<151> 25-08-2003

10

<160> 11

<170> Patent In versión 3.2

<210> 1

<211> 2190

15

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

<400> 1

```

gctcgagac aacaacatgc ttctcatcaa catggaggga agagggaggg agaaagtgtc      60
gctgggtcac ctccattgtc acaetageca ctggccagct ctcccacacc accaatgcca      120
ggggcgaget ttagcacagc caccgcttca cctccaccac cgcactacce tagcttcgcc      180
caacagccac cgtcaacgcc tcctctccgt caacataaga gagagagaga agaggagagt      240
agccatgtgg ggaggaggaa tagtacatgg ggccatccgt ttggcaagtt attttgggtt      300
gccaaagttag gccaaataagg ggagggattt ggccatccgg ttggaaaggt tatttgggta      360
gtatcttttt actagaattg tcaaaaaaaaa atagtttgag agccatttgg agaggatggt      420
gcctgttaga ggtgctctta ggacatcaaa ttccataaaa acatcagaaa aattctctcg      480
atgaagattt ataaccacta aaactgccct caattogaag ggagttcaaa acaattaataa      540
tcatgttcga attgagtttc aatttcaatt taaccocctt gaaatctcaa tggtaaaaca      600
tcaaccocgtc aggtagcatg gttcttttta ttcccttcaa aaagagttaa ttacaaacag      660
aatcaaaaact aacagttagg cccaaggccc atccgagcaa acaatagatc atgggccagg      720
cctgccacca cctccccct cctggtccc gctcttgaat ttcaaaatcc aaaaatatcg      780
gcacgactgg ccgccgacgg agcgggaggga aaatgacgga acaaccctc gaattctacc      840
ccaactacgc ccaccaacco acacgccact gacaatccgg tcccaccctt gtgggcccac      900
ctacaagcga gacgtcagtc gctcgcagca accagtgggc ccacctcca gtgagcggcg      960
ggtagatctg gactcttacc caccacact aaacaaaacg gcatgaatat tttgactaa      1020
aacctcaga aaaattccga tattccaaac cagtacagtt cctgaccgtt ggaggagcca      1080

```

20

ES 2 625 486 T3

aagtggagcg gagtgtaaaa ttgggaaact taatcgaggg ggttaaacgc aaaaacgccg 1140
 aggcgcctcc cgetctatag aaaggggagg agtgggaggt ggaaacccta ccacaccgca 1200
 gagaaaggcg tcttcgtact cgcctctctc cgcgcctcc tccgcgcgcg ctgcgcgcgcg 1260
 ttcgtctccg ccgccaccgg ctagccatcc aggtaaaaca aacaaaaacg gatctgatgc 1320
 ttccattcct ccgtttctcg tagtagcgcg cttcgatctg tgggtggatc tgggtgatcc 1380
 tgggggtgtg ttcgttctgt ttgatagatc tgtcgggtga tctggccttc tgtggttgtc 1440
 gatgtccgga tetgcgtttt gatcagtggg agttcgtgga tetggcgaaa tgttttggat 1500
 ctggcagtga gacgctaaga atcgggaaat gatgcaatat taggggggtt tccgatgggg 1560
 atccactgaa ttagtctgtc tccctgctga taatctgttc ctttttggtg gatctggtta 1620
 gtgtatgttt gtttcggata gatctgatca atgcttgttt gttttttcaa attttctacc 1680
 taggttgtat aggaatggca tgcggatctg gttggattgc catgatccgt gctgaaatgc 1740
 ccctttggtt gatggatctt gatattttac tgctgttccac ctagatttgt actcccgttt 1800
 atacttaatt tgttgcttat tatgaataga tctgtaactt aggcacatgt atggacggag 1860
 tatgtggatc tgtagtatgt acattgctgc gagctaagaa ctatttcaga gcaagcacag 1920
 aaaaaaatat ttagacagat tgggcaacta tttgatggtc tttggtatca tgctttgtag 1980
 tgctcgtttc tgcgtagtaa tcttttgatc tgatctgaag ataggtgcta ttatattctt 2040
 aaaggtcatt agaacgctat ctgaaaggct gtattatgtg gattggttca octgtgactc 2100
 cctgttcgtc ttgtcttgat aaatcctgtg ataaaaaaaa ttcttaagge gtaatttggt 2160
 gaaatcttgt tttgtcctat gcagcctgat 2190

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

5

<400> 2

ES 2 625 486 T3

gcctogagac aacaacatgc ttctcatcaa catggagggga agagggaggg agaaagtgtc 60
 gcctggtcac ctccattgtc aactagcca ctggccagct ctcccacacc accaatgcca 120
 ggggagagct ttagcacagc caccgcttca cctccaccac cgcactacc tagcttgcgc 180
 caacagccac cgtcaacgcc tctctccgt caacataaga gagagagaga agaggagagt 240
 agocatgtgg ggaggaggaa tagtacctgg gccctaccgt ttggcaagtt attttggggt 300
 gccaaagttag gccataaagg ggagggattt ggccatccgg ttggaaaggt tattggggta 360
 gtatcttttt actagaattg tcaaaaaaaaa atagtttgag agccatttgg agaggatggt 420
 gcctgttaga ggtgctotta ggacatcaaa ttccataaaa acatcagaaa aattctctcg 480

 atgaagattt ataaccacta aaactgccct caattogaag ggagttcaaa acaattaaaa 540
 tcatgttcga attgagtffc aatttcactt taaccocctt gaaatctcaa tggtaaaaca 600
 tcaaccgctc aggtagcatg gttcttttta ttctttcaa aaagagttaa ttacaaacag 660
 aatcaaaaact aacagttagg cccaaggccc atccgagcaa acaatagatc atggggccagg 720
 cctgccacca cctccccct cctggctccc getcttgaat ttcaaaatcc aaaaatateg 780
 gcacgactgg ccgccgacgg agcggggcga aatgacgga acaaccctc gaattctacc 840
 ccaactacgc ccaccaacc acacgccact gacaatccgg tcccaccct gtgggcccac 900
 ctacaagcga gacgtcagtc gctcgcagca accagtgggc ccacctcca gtgagcggcg 960
 ggtagatctg gactcttacc caccacact aaacaaaacg gcatgaatat tttgcaacta 1020
 aacctcaga aaaattccga tattccaaac cagtacagtt cctgaccgtt ggaggagcca 1080
 aagtggagcg gagtgtaaaa ttgggaaact taatcgaggg ggttaaagc aaaaacgccg 1140
 agggcctcc cgtctatag aaaggggagg agtgggaggt ggaaacccta ccacaccgca 1200
 gagaaa 1206

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

 <400> 3

5

ES 2 625 486 T3

cagggttcct gectgggtgcc ttggcaatgc ttgattaactg ctgctatcct atgatctgtc 60
 cgtgtgggct tctatctatc agtttgtgtg tctggttttg aaaaacattt gcttttcgat 120
 tatgtagggt ttgctttagc ctttcgctgc tgtgacctgt gttgtttatg tgaaccttct 180
 ttgtggcatc tttaatatcc aagttcgtgg tttgtcgtaa aacgaagcct ctacttcgta 240
 aagttgtgtc tatagcattg aaatcgtttt tttgctcgag aataattgtg acctttagtt 300
 ggcgtgaaac tagttttgga tatctgattc tctggttcgc aatcttgaga tcgctcgtgc 360
 ttagggtgagc taagtgatgt tcctaagtaa atgctcctca ccagaatacg tagctgtgtg 420
 aaaagagaac gcgtgaatac gtagctgtgt aaagattgtg tcccaagtaa acctcagtga 480
 tttttgtttg gatttttaat ttagaaacat tcgactggga ggggctagag ccacacccaa 540
 gttcctaact atgataaagt tgctctgtaa cagaaaacac ca 582

5

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

<400> 4

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

10

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

15

<400> 5

ES 2 625 486 T3

ggcgtcttctg tactcgctc tctccgcgcc ctcttcgcc gcagctcgcc gccgttctc 60

tccgcgccca ccgctagcc atccag 86

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

10 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico sintético

<400> 6
gacaagcttg cctcgagaca acaacatgct tc 32

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

20 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico sintético

<400> 7
attccatggc ggctagccgg tggcggcgga gacgaacg 38

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

30 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico sintético

35 <400> 8
cgagctagcc atccaggtaa aacaacaaa aacggatct 39

40 <210> 9
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico sintético

45 <400> 9
attccatgga tcaggctgca taggacaaaa caag 34

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

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico sintético

55 <400> 10
tagagagctc cagggttctt gcctggtgcc ttg 33

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

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico sintético

<400> 11

acttctagat ggtgtttct gttacagagc aac

33

5

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ADN que comprende una molécula de polinucleótido que tiene actividad génica reguladora y que
 - (i) comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 2, o
 - (ii) consta de una secuencia polinucleotídica con al menos un 98 % de identidad secuencial con la secuencia polinucleotídica de longitud completa de SEQ ID NO: 2 que proporciona expresión en estructuras florales en desarrollo,

en la que dicha molécula de polinucleótido está unida operativamente a un transgén de interés.
2. La construcción de ADN de la reivindicación 1, en la que dicho transgén de interés es un gen marcador.
3. La construcción de ADN de la reivindicación 1, en la que dicho transgén de interés es un gen de interés agronómico, preferentemente dicho gen de interés agronómico es un gen con tolerancia a herbicidas seleccionado de genes que codifican fosfinotricina acetiltransferasa, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa resistente a glifosato, hidroxifenil piruvato deshidrogenasa, dalapón deshalogenasa, nitrilasa resistente a bromoxinil, antranilato sintasa, glifosato oxidorreductasa y glifosato-N-acetil transferasa.
4. Una planta transgénica transformada de forma estable con, y que comprende, una construcción de ADN que comprende una molécula de polinucleótido que tiene actividad génica reguladora y que
 - (i) comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 2, o
 - (ii) consta de una secuencia polinucleotídica con al menos un 98 % de identidad secuencial con la secuencia polinucleotídica de longitud completa de SEQ ID NO: 2 que proporciona expresión en estructuras florales en desarrollo,

en la que dicha molécula de polinucleótido está unida operativamente a un transgén de interés.
5. La planta transgénica de la reivindicación 4, en la que dicho transgén de interés es un gen exógeno.
6. La planta transgénica de la reivindicación 4 o 5, en la que dicho transgén de interés es un gen marcador.
7. La planta transgénica de la reivindicación 4 o 5, en la que dicho transgén de interés es un gen de interés agronómico, preferentemente dicho gen de interés agronómico es un gen con tolerancia a herbicidas seleccionado de genes que codifican fosfinotricina acetiltransferasa, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa resistente a glifosato, hidroxifenil piruvato deshidrogenasa, dalapón deshalogenasa, nitrilasa resistente a bromoxinil, antranilato sintasa, glifosato oxidorreductasa y glifosato-N-acetil transferasa.
8. La planta transgénica de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en la que dicha planta es una monocotiledónea seleccionada de trigo, maíz, centeno, arroz, avena, cebada, césped, sorgo, mijo y caña de azúcar.
9. La planta transgénica de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en la que dicha planta es una dicotiledónea seleccionada de tabaco, tomate, patata, soja, algodón, colza, girasol y alfalfa.
10. Una semilla de dicha planta transgénica de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende la construcción de ADN de las reivindicaciones 4 a 7.
11. Una molécula de polinucleótido aislada que tiene actividad génica reguladora y que
 - (i) comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 2, o
 - (ii) consta de una secuencia polinucleotídica con al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de longitud completa de SEQ ID NO: 2 que proporciona expresión en estructuras florales en desarrollo.
12. Un procedimiento para inhibir el crecimiento de malas hierbas en un campo de plantas de cultivo transgénicas tolerantes a glifosato que comprende:
 - (i) plantar las plantas transgénicas transformadas con un casete de expresión que comprende una molécula de polinucleótido que tiene actividad génica reguladora y que comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 2 y que está unida operativamente a una molécula de ADN que codifica un gen de tolerancia a glifosato y
 - (ii) aplicar glifosato al campo a un índice de aplicación que inhiba el crecimiento de malas hierbas,

en el que el crecimiento y el rendimiento de la planta de cultivo transgénica no se ven sustancialmente afectados por la aplicación de glifosato.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicho gen de tolerancia a glifosato se selecciona de un gen que codifica una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa resistente a glifosato, una glifosato oxidorreductasa y una glifosato N-acetil-transferasa.

14. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que

- (i) las plantas transgénicas son capaces de tolerar una tasa de aplicación de hasta 17,93 kg/ha ; o
- (ii) las plantas transgénicas son capaces de tolerar una tasa de aplicación que varía de 0,56 a 8,97 kg/ha ; o
- (iii) las plantas transgénicas son capaces de tolerar una tasa de aplicación que varía de 2,24 a 6,72 kg/ha ; o
- (iv) la aplicación de glifosato se realiza al menos una vez durante el crecimiento del cultivo.

5

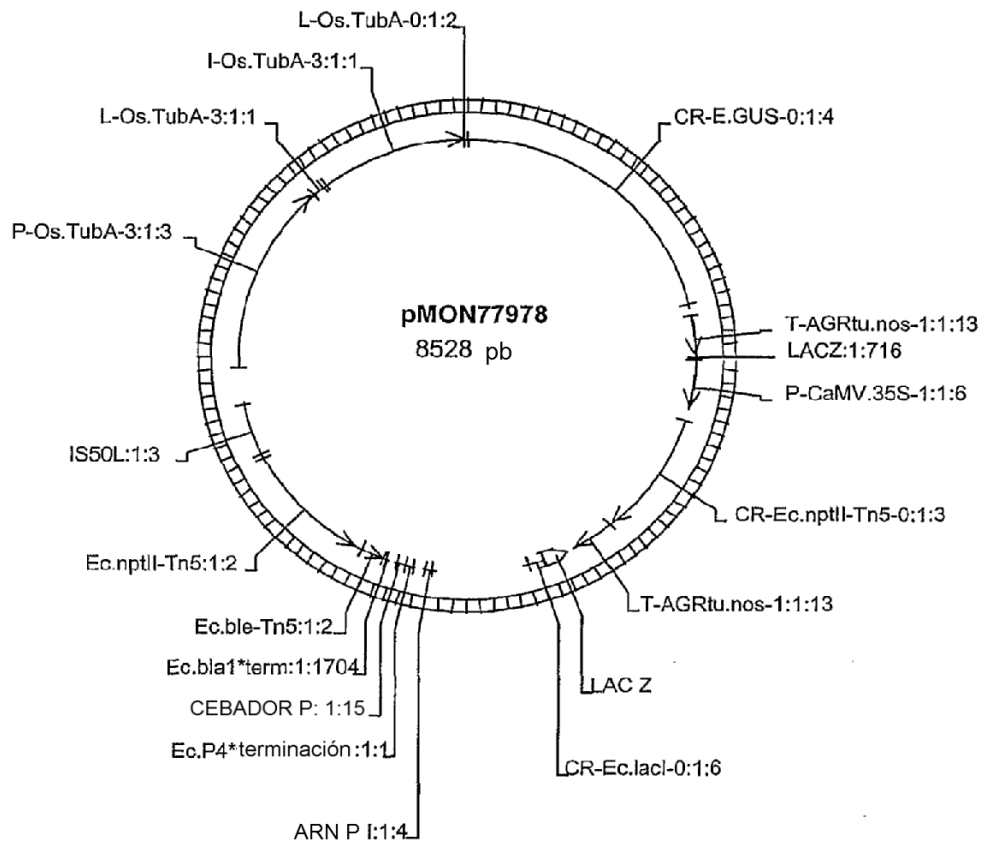


Figura 1

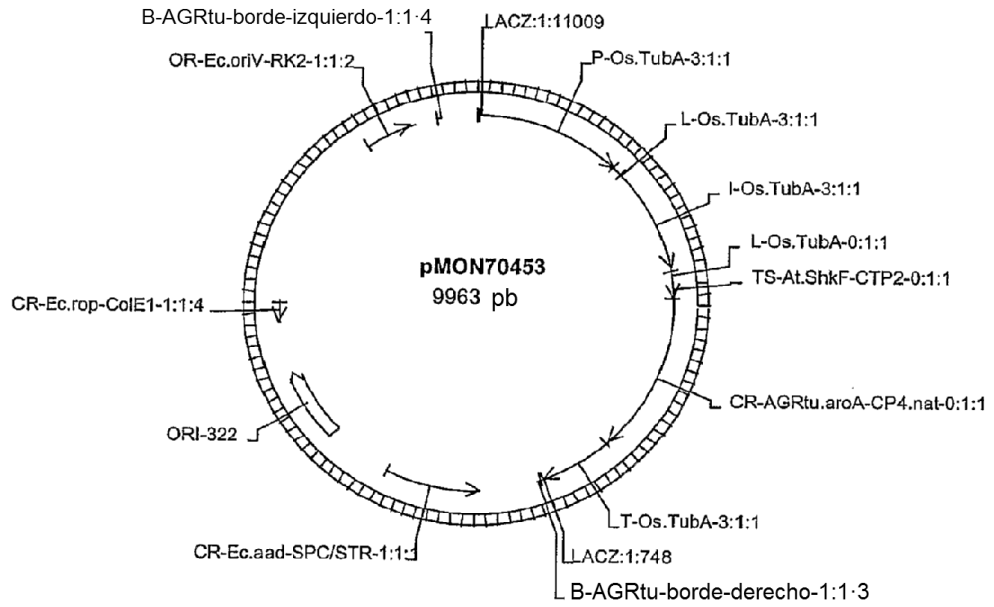


Figura 2