

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 554**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.08.2004 PCT/US2004/027702**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2005 WO05021718**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2004 E 04786581 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 1658364**

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:

**23.10.2017**

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)  
800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD  
ST. LOUIS, MISSOURI 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 2 638 554 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Elementos reguladores de tubulina para su uso en plantas

**Campo de la invención**

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

**Antecedentes**

10 Uno de los objetivos de la ingeniería genética en plantas es producir plantas con características y rasgos convenientes desde el punto de vista agronómico. Una forma de lograr este objetivo es la expresión apropiada de un transgén conveniente en una planta transgénica. Los elementos reguladores tales como promotores, líderes e intrones, son moléculas polinucleotídicas no codificantes que desempeñan una parte integral de la expresión global de los genes en las células vivas. Los elementos reguladores aislados que actúan en plantas son, por lo tanto, útiles para modificar los fenotipos de las plantas a través de procedimientos de ingeniería genética.

15 Están disponibles muchos elementos reguladores útiles para proporcionar una buena expresión global de un transgén. Por ejemplo, los promotores constitutivos tales como P-FMV, el promotor del transcrito 35S del virus del mosaico de Figwort (Patente de Estados Unidos n.º 6.051.753); 35S de P-CaMV, el promotor del transcrito de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (Patente de Estados Unidos 5.530.196); P-Rice Actina 1, el promotor del gen de la actina 1 de *Oryza sativa* (Patente de Estados Unidos 5.641.876) y P-NOS, el promotor del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* son conocidos por proporcionar algún nivel de expresión génica en la mayor parte o en todos los tejidos de una planta durante la mayor parte o toda la vida de la planta. Aunque trabajos anteriores han proporcionado varios elementos reguladores útiles para influir en la expresión génica en plantas transgénicas, sigue habiendo una gran necesidad de nuevos elementos reguladores con características de expresión beneficiosas. Muchos elementos reguladores identificados anteriormente no logran proporcionar los patrones o niveles de expresión necesarios para materializar plenamente los beneficios de la expresión de genes seleccionados en plantas de cultivo transgénicas.

20 La organización espacial dentro de la célula eucariota y los movimientos dirigidos de los contenidos celulares están mediados por el citoesqueleto, una red de polímeros proteicos filamentosos que se extienden por citosol. La tubulina es una de las tres familias principales de proteínas que componen el citoesqueleto. Se han descrito miembros de esta familia multigénica en casi todas las especies eucariotas incluyendo levaduras, seres humanos, ratón, *Drosophila*, tabaco, maíz, arroz, soja, patata y *Arabidopsis*. En los eucariotas superiores existen dos tipos de proteínas tubulina, la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -tubulina. Dos familias génicas codifican las  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulinas vegetales, cada una constituida por varios isotipos distintos.

25 Los inventores han formulado la hipótesis de que un promotor procedente de un gen de  $\alpha$ -tubulina 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 de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) resistente a glifosato, para producir una planta tolerante a glifosato. La producción eficaz de plantas tolerantes a glifosato requiere el uso de un promotor y de elementos reguladores que tengan la capacidad de dirigir la expresión del transgén en todos los tejidos, incluyendo los órganos reproductores más sensibles tales como las anteras y los tejidos meristemáticos. La presente invención proporciona así tales promotores y elementos reguladores aislados a partir de un gen de  $\alpha$ -tubulina de *Oryza sativa*.

**Sumario**

30 Por lo tanto, la invención proporciona moléculas polinucleotídicas aisladas de *Oryza sativa* útiles para modular la expresión de transgenes en plantas, en particular

(1) una construcción de ADN que comprende una molécula polinucleotídica que tiene actividad reguladora de genes y

45 (i) que comprende una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1, o  
(ii) que consiste en una secuencia polinucleotídica con al menos el 98 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de longitud completa de SEQ ID NO: 1 que proporciona expresión en estructuras florales en desarrollo,

50 en la que dicha molécula polinucleotídica está unida operativamente a un transgén de interés;  
(2) una planta transgénica que comprende la construcción de ADN como se define en (1) anterior;  
(3) una semilla de dicha planta transgénica como se define en (2) anterior, que comprende la construcción de ADN de (1) anterior;  
(4) una molécula polinucleotídica aislada que tiene actividad reguladora de genes y

55 (i) que comprende una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1, o

(ii) que consiste en una secuencia polinucleotídica con al menos el 98 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de longitud completa de SEQ ID NO: 1, que proporciona expresión en estructuras florales en desarrollo; y (5) un procedimiento de inhibición del crecimiento de malas hierbas en un campo de plantas de cultivo transgénicas tolerantes a glifosato, que comprende:

- 5 (i) plantar las plantas transgénicas transformadas con un casete de expresión que comprende una molécula polinucleotídica que tiene actividad reguladora de genes y que comprende una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1, y está unida operativamente a una molécula de ADN que codifica un gen de tolerancia a glifosato y
- 10 (ii) aplicar glifosato al campo a una tasa de aplicación que inhiba el crecimiento de malas hierbas, en la que el crecimiento y la producción de la planta de cultivo transgénica no está sustancialmente afectada por la aplicación de glifosato.

**Breve descripción de los dibujos**

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

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

20 **Descripción detallada**

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 otra cosa, los expertos en la materia deben entender los términos de acuerdo con el uso convencional.

25 La invención desvelada en el presente documento proporciona moléculas polinucleotídicas procedentes de *Oryza sativa* que tienen actividad reguladora de genes. El diseño, construcción y uso de estas moléculas polinucleotídicas son un objeto de la invención. Las secuencias polinucleotídicas de estas moléculas polinucleotídicas se proporcionan en SEQ ID NO: 1. Estas moléculas polinucleotídicas tienen la capacidad de afectar la transcripción de moléculas polinucleotídicas transcribibles unidas operativamente tanto en tejidos vegetativos como reproductivos vegetales y, por lo tanto, pueden regular de forma selectiva la expresión de transgenes en estos tejidos.

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

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

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "actividad reguladora de genes" se refiere a una molécula polinucleotídica que tiene la capacidad de afectar la transcripción o la traducción de una molécula polinucleotídica transcribible unida operativamente. Una molécula polinucleotídica aislada que tiene actividad reguladora de genes puede proporcionar expresión temporal o espacial, o modular los niveles y tasas de expresión de la molécula polinucleotídica transcribible unida operativamente. Una molécula polinucleotídica aislada que tiene actividad reguladora de genes puede comprender un promotor, un intrón, un líder o una región 3' de terminación de la transcripción.

40 Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a una molécula polinucleotídica que está implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa II, y 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 utilizarse como un elemento regulador 5' para modular la expresión de un gen o genes unidos operativamente. Los promotores vegetales pueden definirse por su patrón de expresión temporal, espacial o del desarrollo.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio potenciador" se refiere a un elemento regulador transcripcional que actúa en *cis*, también conocido como elemento en *cis*, que otorga un aspecto del control global de la expresión génica. Un dominio potenciador puede actuar 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 distintas afinidades con más de un dominio potenciador. Los dominios potenciadores pueden identificarse mediante varias técnicas, incluyendo el análisis por deleción, es decir, delecionando uno o más nucleótidos del extremo 5' o internos en un promotor; análisis de proteínas de unión a ADN utilizando huella de DNasa I, interferencia por metilación, ensayos de cambio de movilidad en electroforesis, huella genómica *in vivo* por PCR mediada por ligamiento y otros ensayos convencionales; o por análisis de similitud de secuencias de ADN con motivos de elementos en *cis* por procedimientos convencionales de

comparación de secuencias de ADN. La estructura fina de un dominio potenciador puede estudiarse adicionalmente por mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos, o por otros procedimientos convencionales. Los dominios potenciadores pueden obtenerse por síntesis química o por aislamiento a partir de promotores que incluyen tales elementos, y pueden sintetizarse con nucleótidos flanqueantes adicionales que contengan sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar la manipulación posterior. Por lo tanto, se describe en el presente documento el diseño, construcción y uso de dominios potenciadores de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento para la modulación de la expresión de moléculas polinucleotídicas unidas operativamente.

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "identidad de secuencia porcentual" se refiere al porcentaje de nucleótidos idénticos en una secuencia polinucleotídica lineal de una molécula polinucleotídica de referencia (o su cadena complementaria) comparada con una molécula polinucleotídica de prueba (o su cadena complementaria), cuando las dos secuencias se alinean de forma óptima (con inserciones, deleciones o huecos de nucleótidos apropiados que totalizan menos del 20 por ciento de la secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación). El alineamiento óptimo de secuencias para el alinear una ventana de comparación es bien conocido para los expertos en la materia y puede realizarse mediante 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 computarizadas de estos algoritmos tales como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA, disponibles como parte del GCG® Wisconsin Package® (Accelrys Inc., Burlington, MA). Una "fracción de identidad" para segmentos alineados de una secuencia de prueba y de una secuencia de referencia es el número de componentes idénticos que comparten las dos secuencias alineadas dividido por el número total de componentes en el segmento de la secuencia de referencia, es decir, la secuencia de referencia completa o una parte definida más pequeña de la secuencia de referencia. La identidad de secuencia porcentual está representada como la fracción de identidad multiplicada por 100. La comparación de las secuencias polinucleotídicas es con respecto a una secuencia polinucleotídica de longitud completa.

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

#### **Aislamiento de promotores y procedimientos de modificación**

Pueden utilizarse para aislar fragmentos de un promotor desvelado en el presente documento cualquier cantidad de procedimientos bien conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, puede utilizarse la tecnología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar regiones flanqueantes a partir de una biblioteca genómica de una planta, utilizando información de secuencia disponible de forma pública. Los expertos en la materia conocen varios procedimientos para amplificar moléculas polinucleotídicas desconocidas adyacentes a una región central de una secuencia polinucleotídica conocida. Los procedimientos incluyen, pero sin limitación, PCR inversa (IPCR), PCR vectorette, PCR en forma de Y y estrategias de desplazamiento genómico. Los fragmentos de polinucleótido también pueden obtenerse por otras técnicas tales como sintetizando de forma directa el fragmento por medios químicos, como se practica comúnmente utilizando un sintetizador de oligonucleótidos automatizado. Para la presente invención, las moléculas polinucleotídicas se aislaron a partir de ADN genómico diseñando cebadores de PCR basados en la información de secuencia disponible.

Los promotores quiméricos nuevos pueden diseñarse o modificarse por ingeniería genética mediante varios procedimientos. Por ejemplo, puede producirse un promotor quimérico fusionando un dominio potenciador de un primer promotor con un segundo promotor. El promotor quimérico resultante puede tener propiedades de expresión nuevas con respecto al primer o segundo promotor. Los promotores quiméricos nuevos pueden construirse de forma que el dominio potenciador del primer promotor esté fusionado con extremo 5', con el extremo 3' o en cualquier posición interna del segundo promotor. El emplazamiento de la fusión del dominio potenciador con respecto al segundo promotor puede provocar que el promotor quimérico resultante tenga propiedades de expresión nuevas con respecto a una fusión hecha en un emplazamiento distinto.

Los expertos en la materia están familiarizados con los materiales de referencia convencionales que describen las condiciones específicas y los procedimientos para la construcción, manipulación y aislamiento de macromoléculas

(por ejemplo, moléculas polinucleotídicas, plásmidos), así como la generación de organismos recombinantes y la exploración y aislamiento de moléculas polinucleotídicas.

### Construcciones

5 Como se usa en el presente documento, el término “construcción” se refiere a cualquier molécula polinucleotídica recombinante tal como un plásmido, cósmido, virus, molécula polinucleotídica de replicación autónoma, fago o molécula polinucleotídica de ADN o ARN monocatenaria o bicatenaria lineal o circular, obtenida de cualquier fuente, que tenga capacidad de integrarse en el genoma o de replicarse de forma autónoma, que comprenda una molécula polinucleotídica en donde una o más moléculas polinucleotídicas se han unido operativamente.

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

Como se usa en el presente documento, la expresión “molécula polinucleotídica transcribible” se refiere a cualquier molécula polinucleotídica que tiene la capacidad de transcribirse en una molécula de ARN. Se conocen procedimientos para introducir construcciones en una célula de tal modo que la molécula polinucleotídica transcribible se transcriba en una molécula de ARNm funcional que se traduce y, por lo tanto, se expresa como un  
20 producto proteico. Las construcciones también pueden construirse para que tengan la capacidad de expresar moléculas de ARN antisentido para inhibir la traducción de una molécula de ARN específica de interés. Para la práctica de la presente invención, son bien conocida para un experto en la materia las composiciones y procedimientos convencionales para la preparación y uso de construcciones, y las células hospedadoras, 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.  
25

Las construcciones de la presente invención normalmente contendrían un promotor unido operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible unida operativamente a una molécula polinucleotídica de terminación de la transcripción 3'. Además, las construcciones pueden incluir, pero sin limitación, moléculas polinucleotídicas reguladoras adicionales de la región 3' no traducida (3' UTR) de genes vegetales (por ejemplo, una 3' UTR para  
30 aumentar la estabilidad del ARNm del ARNm, tal como la región de terminación PI-II de 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 polinucleotídica de ARNm que puede desempeñar un papel importante en la iniciación de la traducción y también puede ser un componente genético de una construcción de expresión vegetal. Por ejemplo, se ha demostrado que las moléculas polinucleotídicas 5' líder no traducidas obtenidas de  
35 genes de proteínas de choque térmico potencian la expresión génica en plantas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.659.122 y la Patente de Estados Unidos n.º 5.362.865).

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

40 Por lo tanto, un promotor tal como el proporcionado en SEQ ID NO: 1-2, está unido a una molécula polinucleotídica transcribible de forma que, tras la introducción de dicha construcción en una célula vegetal, dirija la transcripción de dicha molécula polinucleotídica transcribible a un nivel deseado o en un tejido o patrón del desarrollo deseado. En algunos casos, la molécula polinucleotídica transcribible comprende una región que codifica una proteína de un gen y el promotor proporciona la transcripción de una molécula de ARNm funcional que se transcribe y expresa como un  
45 producto proteico. Además, se pueden construir construcciones para la transcripción de moléculas de ARN antisentido u otro ARN inhibidor similar, para inhibir la expresión de una molécula de ARN específica de interés en una célula hospedadora diana.

Las moléculas polinucleotídicas transcribibles ejemplares para la incorporación en construcciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, moléculas polinucleotídicas o genes de una especie que no sea la especie del gen  
50 diana, o incluso genes que proceden de o están presentes en la misma especie, pero se incorporan en las células destinatarias mediante procedimientos de ingeniería genética en lugar de mediante técnicas de reproducción o de mejora genética clásicas. Genes o elementos genéticos exógenos tiene como objetivo referirse a cualquier gen o molécula polinucleotídica que se introduce en una célula destinataria. El tipo de molécula polinucleotídica incluida en la molécula polinucleotídica exógena puede incluir una molécula polinucleotídica que ya esté presente en la célula vegetal, una molécula polinucleotídica de otra planta, una molécula polinucleotídica de un organismo distinto o una  
55 molécula polinucleotídica generada de forma externa, tal como una molécula polinucleotídica que contiene un mensaje antisentido de un gen, o una molécula polinucleotídica que codifica una versión artificial o modificada de un gen.

Los promotores de la presente invención pueden incorporarse en una construcción usando genes marcadores como se describe y analizarse en análisis transitorios que proporcionen un indicio de la expresión génica en sistemas vegetales estables. Como se usa en el presente documento, la expresión "gen marcador" se refiere a cualquier molécula polinucleotídica transcribible cuya expresión puede explorarse o puntuarse de algún modo. Los procedimientos de análisis de la expresión de genes marcadores en ensayos transitorios son conocidos para los expertos en la materia. Se ha descrito la expresión transitoria de genes marcadores en una diversidad de plantas, tejidos y sistemas de suministro de ADN. Por ejemplo, los tipos de análisis transitorios pueden incluir, pero sin limitación, el suministro de genes directo a través de electroporación o del bombardeo de partículas de tejidos en cualquier ensayo de plantas transitorio, utilizando cualquier especie vegetal de interés. Tales sistemas transitorios incluirían, pero sin limitación, la electroporación de protoplastos procedentes de una diversidad de fuentes tisulares o el bombardeo de partículas de tejidos específicos de interés. El uso de cualquier sistema de expresión transitoria para evaluar promotores o fragmentos de promotor unidos operativamente a cualquier molécula polinucleotídica transcribible que incluye, pero sin limitación, genes indicadores seleccionados, genes marcadores o genes de interés agronómico como se describe en el presente documento. Los ejemplos de tejidos vegetales contemplados para analizar en transitorios a través de un sistema de suministro apropiado incluirían, pero sin limitación, tejidos de la base foliar, callos, cotiledones, raíces, endospermo, embriones, tejido floral, polen y tejido epidérmico.

Puede utilizarse en un ensayo transitorio cualquier gen marcador que se pueda puntuar o explorar. Los genes marcadores ejemplares para los análisis transitorios de los promotores o fragmentos de promotor de la presente invención incluyen el gen GUS (Patente de Estados Unidos n.º 5.599.670) o el gen de la GFP (Patente de Estados Unidos n.º 5.491.084 y Patente de Estados Unidos n.º 6.146.826).

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

Por lo tanto, en una realización preferente, se incorpora una molécula polinucleotídica de la presente invención como se muestra en SEQ ID NO: 1 en una construcción, de forma que un promotor de la presente invención está unido operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible que proporciona un marcador de selección, que se pueda explorar o puntuar. Los marcadores para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, moléculas polinucleotídicas transcribibles que codifican la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), la proteína verde fluorescente (GFP), la luciferasa (LUC), proteínas que otorgan resistencia a antibióticos o proteínas que otorgan tolerancia a herbicidas. Son conocidos en la técnica los marcadores de resistencia a antibióticos útiles, incluyendo los genes que codifican proteínas que otorgan resistencia a la kanamicina (*nptII*), higromicina B (*aph IV*), estreptomycin o espectinomycin (*aad*, *spec/strp*) y gentamicina (*aac3* y *aacC4*). Los herbicidas para los que se ha demostrado tolerancia en plantas transgénicas y puede aplicarse el procedimiento descrito en el presente documento, incluyen glifosato, glufosinato, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinilo, delapón, ciclohezanodiona, inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa y herbicidas de isoxasflutol. Son conocidas en la técnica las moléculas polinucleotídicas que codifican proteínas implicadas en la tolerancia a herbicidas e incluyen una molécula polinucleotídica que codifica la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) descrita en la Patente de Estados Unidos n.º 5.627.061, la Patente de Estados Unidos n.º 5.633.435 y la Patente de Estados Unidos n.º 6.040.497, y *aroA* descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 5.094.945 para la tolerancia a glifosato, una molécula polinucleotídica que codifica la bromoxinil nitrilasa (*Bxn*) descrita en la Patente de Estados Unidos n.º 4.810.648, para la tolerancia a bromoxinilo, una molécula polinucleotídica que codifica la fitoeno desaturasa (*crt1*) 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 polinucleotídica que codifica la acetohidroxiácido sintasa (AHAS, también conocida como ALS) descrita en Sathasiivan y col. (1990) Polynucleotides Research 18: 2188-2193, para la tolerancia a herbicidas de sulfonilureas; y el gen *bar* descrito en DeBlock y col. (1987) EMBO Journal 6: 2513-2519, para la tolerancia al glufosinato y bialafos.

En una realización de la invención, se incorpora una molécula polinucleotídica como se muestra en SEQ ID NO: 1 en una construcción de forma que una molécula polinucleotídica de la presente invención esté unida operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible que es un gen de interés agronómico. Como se usa en el presente documento, la expresión "gen de interés agronómico" se refiere a una molécula polinucleotídica transcribible que incluye, pero sin limitación, un gen que proporciona una característica conveniente asociada con la morfología, fisiología, crecimiento y desarrollo vegetal, la producción, la potenciación nutritiva, la resistencia a enfermedades o plagas, o la tolerancia al medio ambiente o química. La expresión de un gen de interés agronómico es conveniente para otorgar un rasgo importante desde el punto de vista agronómico. Un gen de interés agronómico que proporciona un rasgo agronómico beneficioso a plantas de cultivo puede incluir, por ejemplo, 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), alta producción de aceite (Patentes de Estados Unidos n.º 5.608.149 y 6.476.295), contenido de ácidos grasos modificados (Patente de Estados Unidos n.º 6.537.750), alta producción de proteínas (Patente de Estados Unidos n.º 6.380.466), maduración de frutos (Patente de Estados Unidos n.º 5.512.466), alimentación animal o humana potenciada (Patentes de Estados Unidos n.º 5.985.605 y 6.171.640), biopolímeros (Patente de Estados Unidos n.º 5.958.745 y Patente de Estados Unidos n.º de Publicación US 20030028917), 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), baja rafinosa (Patente de Estados Unidos n.º 6.166.296), producción de enzimas industriales (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 biocombustibles (Patente de Estados Unidos n.º 5.998.700).

Como alternativa, una molécula polinucleotídica transcribible puede tener efecto en los fenotipos mencionados anteriormente codificando una molécula de ARN que provoca la inhibición dirigida de la expresión de un gen endógeno, por ejemplo a través de ARN inhibidor antisentido (iARN), o mecanismos mediados por cosupresión. El ARN podría también ser una molécula de ARN catalítica (es decir, una ribozima) modificada por ingeniería genética para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. Por lo tanto, cualquier molécula polinucleotídica que codifique una proteína o ARNm que exprese un cambio de fenotipo o morfología de interés puede ser útil para la práctica de la presente invención.

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

#### Plantas transformadas y células vegetales

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 polinucleotídica ajena, tal como una construcción. La molécula polinucleotídica introducida puede integrarse en el ADN genómico de la célula, tejido, órgano u organismo destinatario, de forma que la progenie posterior herede la molécula polinucleotídica introducida. Una célula u organismo "transgénico" o "transformado" también incluye a la progenie de la célula o del organismo, y la progenie producida a partir de un programa de mejora genética que emplea tal planta transgénica como un parental en un cruzamiento y que presenta un fenotipo modificado a consecuencia de la presencia de una molécula polinucleotídica ajena. Una construcción para la transformación vegetal que contiene un promotor de la presente invención puede introducirse en plantas mediante cualquier procedimiento de transformación vegetal. Los procedimientos y materiales para la transformación vegetal introduciendo una construcción para expresión vegetal en un genoma de planta puede incluir cualquiera de los procedimientos bien conocidos y demostrados, incluyendo la electroporación, como se ilustra en la Patente de Estados Unidos n.º 5.384.253; el bombardeo de 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; la 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 la transformación por protoplastos como se ilustra en la Patente de Estados Unidos n.º 5.508.184.

Los procedimientos para transformar de forma específica dicotiledóneas son bien conocidos para los expertos en la materia. La transformación y la regeneración de plantas utilizando estos procedimientos se han descrito para varios cultivos incluyendo el algodón (*Gossypium hirsutum*), la soja (*Glycine max*), el cacahuete (*Arachis hypogaea*) y los miembros del género *Brassica*.

Los procedimientos para la transformación de monocotiledóneas son bien conocidos por los expertos en la materia. La transformación y la regeneración de plantas utilizando estos procedimientos se han descrito para varios cultivos incluyendo, pero sin limitación, cebada (*Hordeum vulgare*); maíz (*Zea mays*); avena (*Avena saliva*); dátilo (*Dactylis glomerata*); arroz (*Oryza sativa*), incluyendo las variedades indica y japónica; sorgo (*Sorghum bicolor*); caña de azúcar (*Saccharum* sp); cañuela (*Festuca arundinacea*); especies de césped (por ejemplo, las especies: *Agrostis stolonifera*, *Poa pratensis*, *Stenotaphrum secundatum*); trigo (*Triticum aestivum*) y alfalfa (*Medicago sativa*). Es evidente para los expertos en la materia que pueden utilizarse y modificarse varias metodologías de transformación para la producción de plantas transgénicas estables a partir de cualquier número de cultivos diana de interés.

Se analiza en las plantas transformadas la presencia de los genes de interés y el nivel de expresión y/o el perfil conferido por los promotores de la presente invención. Los expertos en la materia conocen los numerosos procedimientos disponibles para el análisis de plantas transformadas. Por ejemplo, los procedimientos para el análisis de plantas incluyen transferencias de Southern o transferencias de Northern, estrategias basadas en PCR, análisis bioquímicos, procedimientos de exploración fenotípica, evaluaciones de campo y ensayos de inmunodiagnóstico.

Las semillas de la presente invención pueden recogerse de plantas transgénicas fértiles y pueden utilizarse para cultivar las generaciones progenie de las plantas transformadas de la presente invención, incluyendo líneas de plantas híbridas que comprenden la construcción de la presente invención y expresan un gen de interés agronómico. También se proporcionan partes de plantas descritas en el presente documento. Las partes de planta incluyen semilla, endospermo, óvulo y polen. En una realización de la presente invención, la parte de planta es una semilla.

Aún otro aspecto de la invención es un procedimiento de inhibición del crecimiento de malas hierbas en un campo de plantas de cultivo transgénicas, que comprende en primer lugar plantar las plantas transgénicas transformadas con un casete de expresión que comprende una molécula polinucleotídica que tiene una actividad reguladora de genes y que comprende una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1, y que está unida operativamente a una molécula de ADN que codifica un gen de tolerancia a glifosato y, después, aplicar glifosato al campo en una tasa 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 están sustancialmente afectados por la aplicación de glifosato. La tasa de aplicación de glifosato es la tasa eficaz necesaria para controlar las malas hierbas en un cultivo tolerante a glifosato particular; estas tasas pueden variar de 0,56 a 17,93 kg/ha (8 a 256 onzas/acre), preferentemente 1,12 a 8,97 kg/ha (16 a 128 onzas/acre) y más preferentemente 2,24 a 6,72 kg/ha (32 a 96 onzas/acre). El glifosato se aplica al menos una vez durante el crecimiento del cultivo tolerante a glifosato y puede aplicarse 2, 3 o 4 veces durante el crecimiento del cultivo, o más, según sea necesario para controlar las malas hierbas en el campo. Los ejemplos no incluidos en el ámbito de las reivindicaciones tienen fines ilustrativos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: identificación de genes constitutivos

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

Las secuencias de la región 5' no traducida (UTR) de los miembros de familias multigénicas seleccionadas (que incluyen la tubulina, la actina, la histona, etc.) se identificaron utilizando la secuencia genómica del arroz. Se diseñaron cebadores para el apareamiento con las secuencias 5' UTR y se realizó PCR utilizando procedimientos convencionales. Los productos de molécula polinucleotídica posteriores se dispusieron en filtros de nylon para el análisis de la expresión de ARNm. Después, los filtros se sondaron con moléculas de ADNc obtenidas de agrupaciones de ARNm de arroz procedentes de tejido de raíz, hoja, grano, antera, ovario o gluma. El experimento se repitió dos veces y los resultados se utilizaron para analizar la expresión de los genes seleccionados. A partir del análisis de los datos de expresión, se escogieron veinte genes para el análisis posterior utilizando PCR en tiempo real con cebadores específicos para 3' UTR. Los cebadores se utilizaron junto con el kit SYBR Green (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA) utilizando una máquina Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA) y protocolos convencionales suministrados por el fabricante, para amplificar secuencias de ADNc de hoja, raíz, antera, gineceo y ápice. Después, los resultados se compararon con el nivel de expresión del gen de la actina 1 de arroz, cuyo promotor y primer intrón se sabe que proporcionan alta tolerancia a glifosato cuando están unidos operativamente a un gen de EPSPS resistente a glifosato. Se ha demostrado que un gen de  $\alpha$ -tubulina, denominado Os-TubA-3, se expresa en arroz en todos los tejidos a niveles superiores que el gen ract1.

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

**Tabla 1: Presencia de las respectivas secuencias 3' UTR en las bibliotecas EST de arroz.**

Biblioteca	Número total de lecturas 5' y 3'	Presencia de actina 1 de arroz	Presencia de Os-TubA-3
panoja, agrietamiento – inflorescencia abierta 3/4	20.227	7	>16
panoja en desarrollo	7.909	5	>16
antera tardía	5.956	14	4
semilla en desarrollo	7.453	1	8
semilla seca	9.362	0	0
semilla germ.	9.743	0	1
ápice vegetativo	7.672	2	>16
hoja, 3-5 hojas	10.040	0	1
hoja, 3-4 brotes	9.209	1	0
hoja, en elongación	7.897	1	3
raíz, 3-5 hojas	10.524	2	4
raíz, 3-4 brotes	10.624	1	9
raíz, tercer brote - leche	7.481	1	3

**Ejemplo 2: construcciones**

5 Se aisló el promotor de Os-TubA-3 de la región genómica cadena arriba del gen Os-TubA-3 para la incorporación en un casete de expresión y la posterior caracterización en plantas transgénicas. Se diseñaron los oligonucleótidos OsTUBA136-1 y OsTUBA136-2 (proporcionados como SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, respectivamente) para amplificar la región 5' (promotor y 5' UTR). La región promotora cadena arriba del gen Os-TubA-3 se amplificó comenzando inmediatamente cadena arriba del codón de iniciación de la traducción y finalizando aproximadamente 1,2 kb inmediatamente cadena arriba del inicio del sitio de iniciación de la transcripción (inferido mediante la observación de la 5' UTR más largo presente para el gen Os-TubA-3 en la recolección EST). La secuencia promotora se proporciona como SEQ ID NO: 2. La secuencia 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 los oligonucleótidos OsTUBA136 -3 y OsTubA136-4 (proporcionados como SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, respectivamente). La secuencia del intrón se proporciona como SEQ ID NO: 4. Después, el intrón se separó de su contexto nativo y se colocó en la 5' UTR inmediatamente cadena arriba del codón de inicio de la traducción para producir un promotor de Os-TubA-3 quimérico. La secuencia promotora quimérica se proporciona como SEQ ID NO: 1.

Después, se crearon las construcciones para la caracterización del promotor de Os-TubA-3 *in planta* para la expresión de un transgén unido operativamente. El promotor se ligó en una construcción de expresión vegetal de forma que el promotor estaba unido operativamente al transgén de interés.

La región 3' de Os-TubA-3 (500-600 pb de la secuencia inmediatamente cadena abajo del codón de terminación de la traducción que incluye la 3' UTR más la secuencia adyacente cadena abajo) también se amplificó utilizando los 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 utilizó en la construcción del vector de transformación vegetal para proporcionar una diversidad de elementos adicional con respecto a las construcciones existentes y para aprovechar cualquier capacidad reguladora (transcripcional o a nivel de estabilidad de ARNm) presente en la secuencia. La región 3' de Os-TubA-3 se ligó en el extremo 3' del transgén de interés. Para la caracterización de la actividad GUS, el vector de transformación vegetal pMON77978, como se muestra en la Figura 1, contiene el gen indicador GUS como transgén de interés. Para la caracterización de la tolerancia a glifosato, el vector de transformación vegetal pMON70453, como se muestra en la Figura 2, contiene el gen CTP2/CP4 EPSPS como transgén de interés.

**Ejemplo 3: Caracterización del promotor en sistemas transitorios**

Se utilizó el vector de expresión vegetal pMON77978 para transformar callos de maíz utilizando bombardeo de partículas para la caracterización del promotor *in planta*. Después, la actividad de GUS se analizó de forma cuantitativa. Los resultados se muestran en la Tabla 2. El promotor de Os-TubA-3 demostró tener un nivel de expresión conveniente en este sistema transitorio.

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

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

**Ejemplo 4: Caracterización del promotor en plantas transgénicas**

Se utilizó el vector de expresión vegetal pMON70453 para transformar maíz utilizando un procedimiento de transformación mediado por *Agrobacterium*. Por ejemplo, se utiliza la cepa desactivada de *Agrobacterium* C58 que porta una construcción de ADN binaria de la presente invención. La construcción de ADN se transfiere a *Agrobacterium* mediante un procedimiento de apareamiento triparental (Ditta y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 77: 7347-7335, 1980). Se inician cultivos líquidos de *Agrobacterium* a partir de reservas en glicerol o a partir de un estriado en placa reciente, y se cultivan durante una noche a 26 °C-28 °C con agitación (aproximadamente 150 rpm) hasta la fase logarítmica de crecimiento medio en medio LB líquido, pH 7,0, que contiene los antibióticos apropiados. Las células de *Agrobacterium* se resuspenden en el medio de inoculación (CM4C líquido) y la densidad se ajusta a una DO<sub>660</sub> de 1. Se inoculan embriones de maíz HillxLH198 de tipo II inmaduros y Hill recientemente aislados con *Agrobacterium* que contiene una construcción y se cocultivan varios días en oscuridad a 23 °C. Después, los embriones se transfieren a medio de retardo y se incuban a 28 °C durante varios o más días. Todos los cultivos posteriores se mantienen a esta temperatura. Los embriones se transfieren a un primer medio de selección que contiene carbenicilina 500/glifosato 0,5 mM. Dos semanas más tarde, el tejido superviviente se transfiere a un segundo medio de selección que contiene carbenicilina 500/glifosato 1,0 mM. Los callos supervivientes se subcultivan cada 2 semanas hasta que se pueden identificar acontecimientos. Esto puede tardar aproximadamente 3 subcultivos en glifosato 1,0 mM. Una vez que se identifican los acontecimientos, se acumula el tejido para la regeneración. Las plántulas (acontecimientos) se transfieren a medio MSOD en recipientes de cultivo y se mantienen durante dos semanas. La eficacia de transformación se determina dividiendo el número de acontecimientos producidos por el número de embriones inoculados. Después, las plantas con raíces se transfieren al suelo. Los expertos en la técnica de procedimientos de transformación de monocotiledóneas pueden modificar este procedimiento para proporcionar plantas monocotiledóneas transgénicas sustancialmente idénticas que contienen las composiciones de ADN de la presente invención, o utilizar otros procedimientos, tales como la pistola de partículas, que se sabe que proporcionan plantas monocotiledóneas transgénicas.

Se generaron aproximadamente 25 acontecimientos por construcción. Los acontecimientos se seleccionaron en medio que contenía glifosato, se transfirieron al suelo y después se llevaron al invernadero. En el invernadero, las plantas se rociaron con glifosato (0,84 kg de equivalente ácido de glifosato-ha<sup>-1</sup>) utilizando la formulación Roundup Ultra aproximadamente en la fase de hojas V4. Las plantas que sobrevivieron sin daños (clorosis <10 % y malformación) se mantuvieron y transfirieron a tiestos grandes. Aproximadamente en la fase V8, se realizó una segunda aplicación de glifosato igual que antes. Esta segunda pulverización era para evaluar la tolerancia reproductiva masculina. Los acontecimientos de las construcciones nuevas se puntuaron para la fertilidad masculina tras la maduración de las espigas. La Clasificación de la Fertilidad Masculina (CFM) se puntúa en un intervalo en donde CFM = 1 es completamente estéril (para espigas que carecen de inflorescencias desarrolladas) y CFM = 5 es desprendimiento completo de polen (para anteras completamente desarrolladas con desprendimiento de polen); CFM = 4-5 se considera comercialmente viable. Se utilizó una combinación de análisis de Taqman y Southern para evaluar el número de copias del transgén en los acontecimientos que se llevaban al invernadero. El análisis de Southern utilizando los elementos nuevos también mostró que estas secuencias heterólogas no presentan hibridación cruzada con las secuencias endógenas de maíz - un atributo significativo para la caracterización de acontecimientos. Estas evaluaciones tempranas son parte de un procedimiento para seleccionar casetes equivalentes a P-Os.Act1/CP4. Los criterios importantes para una construcción satisfactoria incluyen una buena eficacia de transformación (número de acontecimientos producidos/n.º de explantes inoculados) y la capacidad de proporcionar de forma reproducible transformantes tolerantes de forma vegetativa y de forma reproductiva que porten una única copia del transgén. En la Tabla 3 se muestra un resumen de las evaluaciones de la transformación temprana y en el invernadero. Los acontecimientos de única copia que pasaron a las evaluaciones en el invernadero prosiguieron a las evaluaciones de campo.

**Tabla 3: evaluaciones de transformación temprana y en el invernadero.**

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

5 Las evaluaciones de campo se realizaron en Puerto Rico con plantas de maíz de la generación F2. Las plantas se trataron con dos aplicaciones de 3,36 kg de equivalente de ácido de glifosato·ha<sup>-1</sup> en una formulación de Roundup UltraMax™ (4X superior a la tasa actual de uso de campo). Se realizó un tratamiento en la fase V4 y el segundo tratamiento se realizó en la fase V8. Las clasificaciones vegetativas para la clorosis (clorosis <10 %) y la malformación (malformación <10 %) se tomaron 10 días tras el tratamiento. Las clasificaciones para la fertilidad masculina (CFM) se tomaron en la madurez de la espiga. Para una comparación, se evaluó el acontecimiento comercial NK603 (pMON25496 que contiene P-Os.Act1/CP4 EPSPS::P-e35S/CP4 EPSPS). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4: Evaluación de campo.**

Construcción	Número de Acontecimientos	Acontecimientos que pasaron la clasificación de malformación de V8	Acontecimientos que pasaron la clasificación de clorosis de V8	Acontecimientos que pasaron las clasificaciones vegetativas y CFM = 4-5
P-Os.Act1 + E35S NK603	1	1	1	1
P-Os.TubA-3 pMON70453	7	6	6	6

10 Se midió después la acumulación de la proteína CP4 EPSPS (µg/mg de proteína total mostrado como la media ± error típico) en diversos tejidos de maíz para los acontecimientos de copia única en plantas hemigotas F1 que mostraron una buena eficacia de campo para la tolerancia a glifosato. Para una comparación, el acontecimiento comercial NK603 tiene aproximadamente 21 ppm o aproximadamente 1,4 µg de CP4 EPSPS/mg de proteína total en la fase de lámina foliar V4 cuando se cultiva en condiciones similares. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

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

Construcción	Número de acontecimientos de copia única	Lámina foliar V4 en la fase V4	Lámina foliar V9-10 en la fase V9-10	Espiga 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

- 20 <110> Monsanto Technology, LLC  
Heck, Gregory R  
Malven, Marianne  
Masucci, James D  
You, Jinsong
- 25 <120> Elementos reguladores de tubulina para su uso en plantas
- <130> 38-21(53419)B
- 30 <140> US 60/497.523  
<141> 25-08-2003
- <160> 11
- 35 <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1  
<211> 2190  
<212> ADN
- 40 <213> *Oryza sativa*
- <400> 1

ES 2 638 554 T3

gcctcgagac aacaacatgc ttctcatcaa catggagggg agagggaggg agaaagtgtc 60  
gcctggtcac ctccattgtc aactagcca ctggccagct ctcccacacc accaatgcca 120  
ggggcgagct ttagcacagc cacogttca cctccaccac cgcactaccc tagcttggcc 180  
caacagccac cgtcaagcc tctctccgt caacataaga gagagagaga agaggagagt 240  
agccatgtgg ggaggaggaa tagtacatgg ggcctaccgt ttggcaagtt attttgggtt 300  
gccaaagttag gccataagg ggagggattt gccatccgg ttggaaaggt tattggggta 360  
gtatcttttt actagaattg tcaaaaaaaaa atagtttgag agccatttgg agaggatgtt 420  
gcctgtaga ggtgctctta ggacatcaaa ttccataaaa acatcagaaa aattctctcg 480  
atgaagattt ataaccacta aaactgcct caattcgaag ggagttcaaa acaattaa 540  
tcatgttoga attgagtttc aatttcactt taaccctttt gaaatctca tggtaaaaca 600  
tcaaccogtc aggtagcatg gttcttttta ttctttcaa aaagagtaa ttacaaacag 660  
aatcaaaact aacagttagg cccaaggccc atccgagcaa acaatagatc atgggccagg 720  
cctgccacca cctccccct cctggctccc gctcttgaat ttcaaatcc aaaaatatcg 780  
gcacgactgg cgcgcgacgg agcgggggga aatgacgga acaaccctc gaattctacc 840  
ccaactaogc ccaccaacc acacgcact gacaatccgg toccaccctt gtgggccac 900  
ctacaagoga gacgtcagtc gctgcagca accagtgggc ccacctcca gtgagcggcg 960  
gtagatctg gactcttacc caccacact aaacaaaacg gcatgaatat tttgactaa 1020  
aacctcaga aaaattcga tattcacaac cagtacagtt cctgaccgtt ggaggagcca 1080  
aagtggagcg gagtgtaaaa ttgggaaact taatcgaggg ggttaaaccg aaaaacgccg 1140

ES 2 638 554 T3

```

aggcgcctcc cgctctatag aaaggggagg agtgggaggt ggaaaccocta ccacaccgca 1200
gagaaaggcg tottcgtact cgcctctctc cgcgcctcc tccgccgcgc ctcgcgcgcg 1260
ttcgtctccg cggccaccgg ctagccatcc aggtaaaaca aacaaaaacg gatctgatgc 1320
ttccattcct cggtttctcg tagtagcgcg cttcgatctg tgggtggatc tgggtgatcc 1380
tggggtgtgg ttogttctgt ttgatagatc tgtcgggtga tctggccttc tgtggttgtc 1440
gatgtccgga tctgcgtttt gatcagtggt agttcgtgga tctggcgaaa tgttttgat 1500
ctggcagtga gacgctaaga atcgggaaat gatgcaatat taggggggtt tcggatgggg 1560
atccactgaa ttagtctgtc tcctgctga taatctgttc ctttttggtg gatctgggta 1620
gtgtatgttt gtttcggata gatctgatca atgcttgttt gttttttcaa atttctacc 1680
taggttgat aggaatggca tgcggatctg gttggattgc catgatccgt gctgaaatgc 1740
ccctttggtt gatggatctt gatattttac tgctgttcac ctagatttgt actcccgttt 1800
atacttaatt tgttgcttat tatgaataga tctgtaactt aggcacatgt atggacggag 1860
tatgtggatc tgtagtatgt acattgctgc gagctaagaa ctatttcaga gcaagcacag 1920
aaaaaatat ttagacagat tgggcaacta tttgatggtc tttggtatca tgctttgtag 1980
tgctcgtttc tgcgtagtaa tcttttgatc tgatctgaag ataggtgcta ttatattctt 2040
aaaggtcatt agaacgctat ctgaaaggct gtattatgtg gattggttca cctgtgactc 2100
cctgttcgtc ttgtcttgat aaatcctgtg ataaaaaaaa ttcttaaggc gtaatttgtt 2160
gaaatcttgt tttgtcctat gcagcctgat 2190

```

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

5

ES 2 638 554 T3

gcctogagac aacaacatgc ttctcatcaa catggagggg agagggaggg agaaagtgtc 60  
gcctggtcac ctccattgtc aactagcca ctggccagct ctcccacacc accaatgcca 120  
ggggcgagct ttagcacagc cacogcttca cctcoaccac cgcactacco tagcttggcc 180  
caacagccac cgtcaacgoc toctctcogt caacataaga gagagagaga agaggagagt 240  
agccatgtgg ggaggaggaa tagtacctgg ggccatccgg ttggcaagtt attttgggtt 300  
gccaaagttg gccataaagg ggagggattt ggccatccgg ttggaaaggt tattggggta 360  
gtatcttttt actagaattg tcaaaaaaaaa atagtttgag agccatttgg agaggatgtt 420  
gcctgttaga ggtgctctta ggacatcaaa ttccataaaa acatcagaaa aattctctcg 480  
atgaagattt ataaccacta aaactgcocct caattcgaag ggagttcaaa acaattaaaa 540  
tcatgttoga attgagtttc aatttcactt taaccocctt gaaatctcaa tggtaaaaca 600  
tcaaccogtc aggtagcatg gttcttttta ttcotttcaa aaagagttaa ttacaaacag 660  
aatcaaaact aacagttagg cccaaggccc atcogagcaa acaatagatc atgggcccagg 720  
cctgccacca cctccccct cctggctccc gctottgaat ttcaaaatcc aaaaatatcg 780  
gcaogactgg ccgccgacgg agcgggaggga aatgacgga acaaccocct gaattctacc 840  
ccaactacgc ccaccaacc acacgccact gacaatccgg tcccaccott gtgggcccac 900  
ctacaagcga gacgtcagtc gctcgcagca accagtgggc ccacctcca gtgagcggcg 960  
ggtagatctg gactcttacc caccacact aaacaaaacg gcatgaatat tttgcactaa 1020  
aaccctcaga aaaattccga tattccaaac cagtacagtt cctgaccggt ggaggagcca 1080  
aagtggagcg gagtgtaaaa ttgggaaact taatcgaggg ggttaaaccg aaaaacgccg 1140  
aggcgcctcc cgtctatag aaaggggag agtgggaggt ggaaacccta ccacaccgca 1200  
gagaaa 1206

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

5

<400> 3

ES 2 638 554 T3

cagggttctt gcctgggccc ttggcaatgc ttgattactg ctgctatcct atgatctgtc 60  
 cgtgtgggct tctatctatc agtttgtgtg tctggttttg aaaaacattt gcttttogat 120  
 tatgtagggg ttgcttgtag ctttcgctgc tgtgacctgt gttgtttatg tgaaccttct 180  
 ttgtggcatc ttaatatcc aagttcgtgg tttgtcgtaa aacgaagcct ctacttcgta 240  
 aagttgtgtc tatagcattg aaatcgtttt tttgctcgag aataattgtg acctttagtt 300  
 ggcgtgaaac tagttttgga tatctgattc tctggttcgc aatcttgaga togtcgctgc 360  
 ttaggtgagc taagtgatgt tcctaagtaa atgctcctca ccagaatacg tagctgtgtg 420  
 aaaagagaac gcgtgaatac gtagctgtgt aaagattgtg tcccaagtaa acctcagtga 480  
 ttttgtttg gatttttaat ttagaaacat tcgactggga ggggctagag ccacacccaa 540  
 gttcctaact atgataaagt tgctctgtaa cagaaaacac ca 582

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

5

<400> 4

gtaaaacaaa caaaaacgga tctgatgctt ccattcctcc gtttctcgta gtagecgcct 60  
 tcgatctgtg ggtggatctg ggtgatcctg ggggtgtggtt cgttctgttt gatagatctg 120  
 tcgggtggatc tggccttctg tggttgtcga tgtccggatc tgcgttttga tcagtggtag 180  
 ttcgtggatc tggcgaaatg ttttgatctt ggcagtgaga cgctaagaat cgggaaatga 240  
 tgcaatatta ggggggtttc ggatggggat ccaactgaatt agtctgtctc cctgctgata 300  
 atctgttctt ttttggtaga tctggttagt gtatgtttgt ttccgataga tctgatcaat 360  
 gcttgtttgt tttttcaaat tttctacctt ggttgtatag gaatggcatg oggatctggt 420  
 tggattgcca tgatccgtgc tgaaatgccc ctttggttga tggatottga tattttactg 480  
 ctggtcacct agatttgtac tcccgtttat acttaatttg ttgottatta tgaatagatc 540  
 tgtaacttag gcacatgtat ggacggagta tgtggatctg tagtatgtac attgctgoga 600  
 gctaagaact atttcagagc aagcacagaa aaaaatattt agacagattg ggcaactatt 660  
 tgatggtctt tggatcatg ctttgtagtg ctcgtttctg cgtagtaatc ttttgatctg 720  
 atctgaagat aggtgctatt atattcttaa aggtcattag aacgctatct gaaaggctgt 780  
 attatgtgga ttggttcacc tgtgactccc tgttctctt gtcttgataa atoctgtgat 840  
 aaaaaaatt ctttaaggcgt aatttgttga aatcttgttt tgtcctatgc ag 892

10

<210> 5  
 <211> 86  
 <212> ADN

ES 2 638 554 T3

<213> *Oryza sativa*

<400> 5

**ggcgtcttcg tactcgctc tctcgcgc ccctctcgcg gcgctcgc gcgcttcgc 60**

5

**tccgcgcga ccggctagcc atccag 86**

<210> 6

<211> 32

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico sintético

15

<400> 6

gacaagctg cctcgagaca acaacatgct tc 32

<210> 7

<211> 38

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico sintético

25

<400> 7

attccatggc ggctagccgg tggcggcgga gacgaacg 38

<210> 8

<211> 39

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico sintético

35

<400> 8

cgagctagcc atccaggtaa aacaacaaa aacggatct 39

<210> 9

<211> 34

<212> ADN

40 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico sintético

45

<400> 9

attccatgga tcaggctgca taggacaaaa caag 34

50

<210> 10

<211> 33

<212> ADN

55 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico sintético

60

<400> 10

tagagagctc cagggttctt gcctggtgcc ttg 33

<210> 11

<211> 33

<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Cebador oligonucleotídico sintético

<400> 11  
ctctagat ggtgtttct gttacagagc aac 33

10

**REIVINDICACIONES**

1. Una construcción de ADN que comprende una molécula polinucleotídica que tiene actividad reguladora de genes y
- 5 (i) que comprende una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1, o  
(ii) que consiste en una secuencia polinucleotídica con al menos el 98 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de longitud completa de SEQ ID NO: 1, que proporciona expresión en el desarrollo de estructuras florales,
- en la que dicha molécula polinucleotídica 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.
- 10 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 de tolerancia a herbicida seleccionado de los genes que codifican la fosfinotricina acetiltransferasa, la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa resistente a glifosato, la hidroxifenil piruvato deshidrogenasa, la dalapón deshalogenasa, la nitrilasa resistente a bromoxinilo, la antranilato sintasa, la glifosato oxidorreductasa y la glifosato-N-acetil transferasa.
- 15 4. Una planta transgénica que comprende la construcción de ADN de la reivindicación 1.
5. La planta transgénica de la reivindicación 4, en la que dicha planta es una monocotiledónea seleccionada de trigo, maíz, centeno, arroz, avena, cebada, césped, sorgo, mijo y caña de azúcar.
6. La planta transgénica de la reivindicación 4, en la que dicha planta es una planta dicotiledónea seleccionada de tabaco, tomate, patata, soja, algodón, colza, girasol y alfalfa
- 20 7. Una semilla de dicha planta transgénica de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende la construcción de ADN de la reivindicación 1.
8. Una molécula polinucleotídica aislada que tiene actividad reguladora de genes y
- 25 (i) que comprende una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1, o  
(ii) que consiste en una secuencia polinucleotídica con al menos el 98 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de longitud completa de SEQ ID NO: 1, que proporciona expresión en el desarrollo de estructuras florales.
9. Un procedimiento de inhibición del crecimiento de malas hierbas en un campo de plantas de cultivo transgénicas tolerantes a glifosato que comprende:
- 30 (i) plantar las plantas transgénicas transformadas con un casete de expresión que comprende una molécula polinucleotídica que tiene actividad reguladora de genes y que comprende una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1, y está unida operativamente a una molécula de ADN que codifica un gen de tolerancia a glifosato y  
(ii) aplicar glifosato al campo a una tasa de aplicación que inhibe el crecimiento de malas hierbas,
- 35 en el que el crecimiento y el rendimiento de la planta de cultivo transgénica no están sustancialmente afectados por la aplicación del glifosato.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho gen de tolerancia a glifosato se selecciona de un gen que codifica una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa resistente a glifosato, una glifosato oxidorreductasa y una glifosato-N-acetil-transferasa.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que
- 40 (i) las plantas transgénicas tienen la capacidad de tolerar una tasa de aplicación de hasta 17,93 kg/ha; o  
(ii) las plantas transgénicas tienen la capacidad de tolerar una tasa de aplicación que varía de 0,56 a 8,97 kg/ha;  
o  
(iii) las plantas transgénicas tienen la capacidad de tolerar una tasa de aplicación que varía de 2,24 a 6,72 kg/ha;  
o
- 45 (iv) la aplicación de glifosato es al menos una vez durante el crecimiento del cultivo.

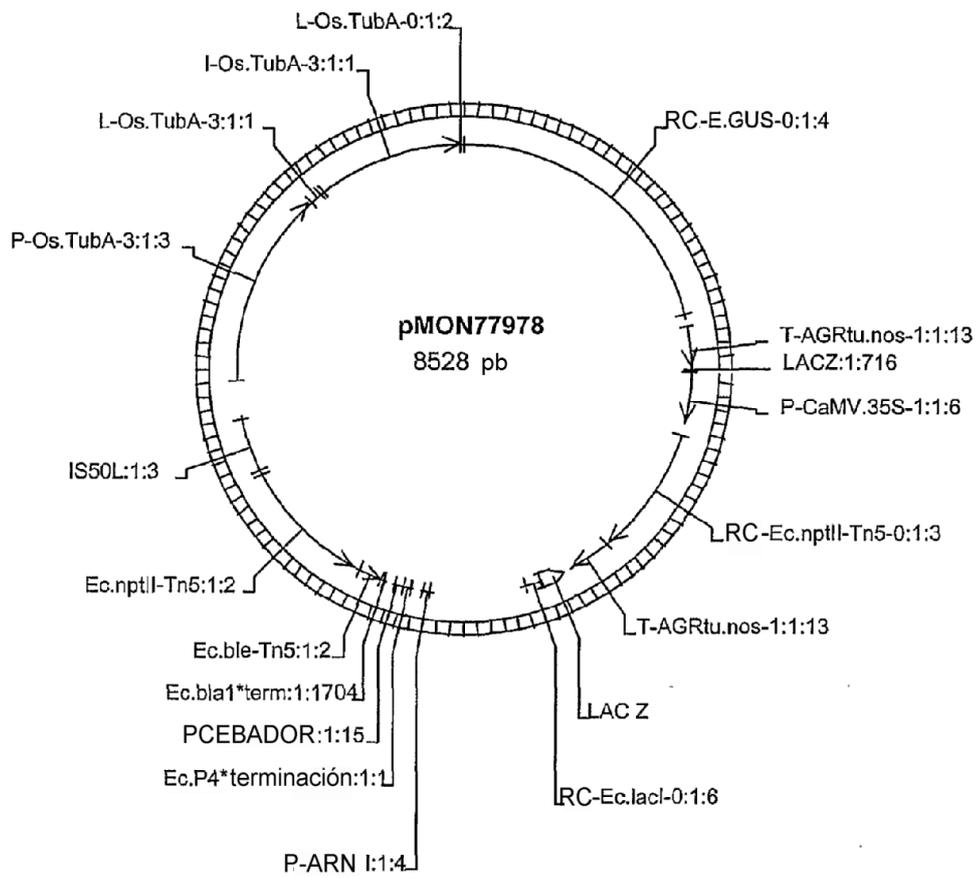


Figura 1

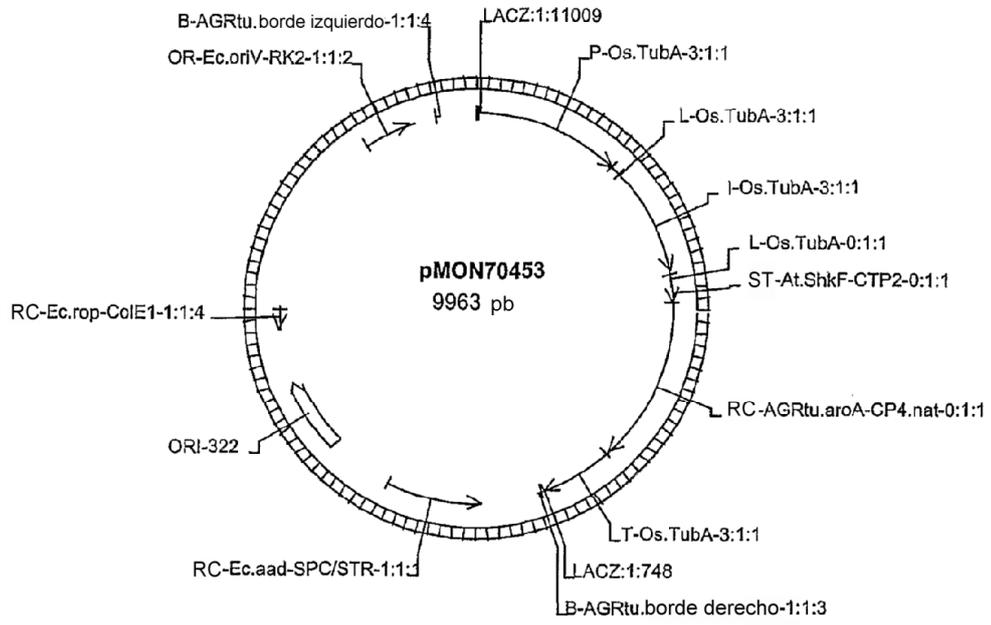


Figura 2