

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 233**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2011 PCT/US2011/049532**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12030711**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2011 E 11758296 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2611925**

54 Título: **Potenciador viral baciliforme de la caña de azúcar (SCBV) y su uso en la genómica vegetal funcional**

30 Prioridad:

30.08.2010 US 402570 P

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

02.03.2018

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES, LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road, Indianapolis
Indiana 46268-1054, US**

72 Inventor/es:

**DAVIES, JOHN, P.;
REDDY, VAKA, S.;
AINLEY, WILLIAM, M. y
THOMPSON, MARK, A.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 657 233 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

Potenciador viral baciliforme de la caña de azúcar (SCBV) y su uso en la genómica vegetal funcional

Reivindicación de prioridad

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense nº 61/402.570, presentada el 30 de agosto de 2010, que se incorpora al presente documento por referencia en su integridad.

Campo

La divulgación se refiere al campo de la biología molecular y la ingeniería genética de plantas y, específicamente, a moléculas de polinucleótidos útiles para modular (por ejemplo, potenciar) la expresión génica y/o la producción de proteínas en plantas.

Antecedentes

10 Existe una constante necesidad de elementos reguladores genéticos que dirijan, controlen o regulen de otro modo la expresión de un ácido nucleico transcribible (por ejemplo, un transgén); por ejemplo, para ser usados en un organismo modificado por ingeniería genética, tal como una planta. Los elementos reguladores genéticos incluyen normalmente secuencias no traducidas 5', tales como regiones de iniciación de transcripción que contienen un factor
15 de transcripción y uno o varios sitios de unión de la ARN polimerasa, elementos potenciadores/silenciadores, una caja TATA y una caja CAAT junto con secuencias de poliadenilación 3', señales de parada de la transcripción, señales de inicio y de parada de la traducción, secuencias de empalme de donadores/aceptores y similares.

20 Para los fines de la ingeniería genética, los elementos reguladores genéticos son normalmente incluidos en un vector de expresión u otro constructo diseñado, para regular la expresión de un transgén operativamente ligado a los elementos reguladores. Ejemplos muy conocidos de promotores usados de esta forma son el promotor CaMV35S (Nagy *et al.* In: *Biotechnology in plant science: relevance to agriculture in the eighties*. Eds. Zaitlin *et al.* Academic Press, Orlando, 1985), el promotor de la ubiquitina del maíz (Ubi; Christensen & Quail, *Transgenic Research* 5:213, 1996) y el promotor de Emu (Last *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 81 581, 1991), aunque muchos otros serán conocidos para las personas con un dominio normal de la técnica. Asimismo, se han aislado potenciadores de fuentes diversas
25 para su uso en la ingeniería genética; estos incluyen el potenciador del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV), un potenciador del virus del mosaico de la escrofularia (FMV), un potenciador del caulimovirus del estriado clorótico del cacahuete (PCISV) o el potenciador del virus del mosaico del melocotonero (MMV).

30 Existe una constante necesidad de identificar elementos reguladores genéticos, tales como dominios potenciadores, que puedan ser utilizados para controlar la expresión de secuencias operativamente ligadas a los mismos; por ejemplo, en moléculas de ácidos nucleicos heterólogos, tales como vectores y otros constructos diseñados.

Compendio de la divulgación

35 La presente divulgación describe regiones novedosas reguladoras de la transcripción que comprenden un dominio potenciador y, bajo el control de potenciamiento del dominio potenciador, un dominio regulador de la transcripción. El dominio potenciador comprende varias copias (por ejemplo, de dos a cuatro o más) de un potenciador natural, pero no reconocido anteriormente, de SCBV dispuestas en tándem. Las regiones reguladoras (promotores) de la transcripción de la presente divulgación proporcionan una transcripción mejorada con respecto al promotor en ausencia del dominio potenciador. En un ejemplo, se da a conocer una región quimérica reguladora de la transcripción que comprende una o más copias del elemento potenciador de SCBV mostrado de la posición 337 a la posición 618 de la SEQ ID NO: 1; y, operativamente ligado al mismo, un promotor que comprende un sitio de unión
40 de la ARN polimerasa y un sitio de iniciación de ARNm, en el que se transcribe una secuencia de nucleótidos de interés bajo el control regulador de la región quimérica reguladora de la transcripción, la cantidad del producto de la transcripción mejora en comparación con la cantidad del producto de la transcripción obtenida con la región quimérica reguladora de la transcripción, que comprende el promotor y no comprende la secuencia potenciadora de SCBV.

45 También se proporcionan constructos de ADN que comprenden una región reguladora descrita de la transcripción y una secuencia de ADN que ha de ser transcrita. En un ejemplo, un constructo de ADN comprende una región de iniciación transcripcional divulgada ligada operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible operativamente ligada a una molécula de polinucleótido de terminación de transcripción en 3'. Los constructos de ADN permiten una transcripción mejorada de la secuencia de ADN que ha de ser transcrita. También se dan a
50 conocer plantas, células o tejidos vegetales transgénicos (tales como plantas, células o tejidos vegetales de dicotiledóneas o monocotiledóneas) transformados con los constructos datos a conocer. también se proporcionan una semilla vegetal, un fruto, una hoja, una raíz, un brote, una flor, un esqueje u otro material reproductivo útil en la propagación sexual o asexual, plantas descendientes, incluyendo híbridos F1, plantas masculinas estériles y todas las demás plantas y los productos vegetales derivables de la planta transgénica divulgada. En la presente memoria
55 también se proporcionan métodos de producción de las plantas, las células o los tejidos vegetales transgénicos divulgados.

Las características anteriores y otras de la divulgación se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que continúa con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La **FIG. 1** muestra la secuencia del promotor de SCBV (correspondiente a las posiciones 6758-7596 del nº de acceso AJ277091.1 de GenBank, "Sugarcane bacilliform IM virus complete genome, isolate Ireng Maleng", que se incorpora a la presente memoria por referencia en su integridad según aparecía en línea el 15 de abril de 2010); esta secuencia también se muestra en la SEQ ID NO: 1. Las secuencias potenciadoras definidas en este estudio se extienden de -222 a -503 y están subrayadas en la Figura (correspondientes de la posición 337 a la posición 618 de la SEQ ID NO: 1).
- 10 Las **FIGURAS 2A y 2B** ilustran los resultados del análisis del promotor de SCBV. La FIG. 2A muestra fragmentos del promotor de SCBV que contienen secuencias del pb -839, del pb -576 y del pb -333 corriente arriba del sitio del inicio de la transcripción y 106 pb corriente abajo del sitio del inicio de la transcripción fusionadas con el gen indicador de la luciferasa (LUC). La FIG. 2B muestra un histograma de la proporción de actividad LUC/GUS de células Hi-II cotransformadas con los plásmidos anteriores y un constructo indicador UBI::GUS. Los resultados muestran que el fragmento promotor que contiene secuencias del pb -576 corriente arriba del sitio del inicio de la transcripción tenía un 60% de la actividad del fragmento promotor que contiene 839 pb corriente arriba del sitio de inicio. En cambio, el fragmento promotor que contiene las secuencias desde el pb -333 corriente arriba del sitio de inicio solo tenía un 10% de la actividad del promotor de longitud máxima (desde el pb -839 corriente arriba del sitio del inicio de la transcripción). Así, las secuencias implicadas en la actividad del promotor residen corriente arriba del pb -333.
- 15 Las **FIGURAS 3A y 3B** ilustran que los elementos potenciadores de SCBV descritos en la presente memoria mejoran la transcripción a partir del promotor Adh1 del maíz. Se clonaron una, dos y cuatro copias de las secuencias promotoras de SCBV de -503 a -222 corriente arriba de un promotor truncado de maíz, fusionado al gen de luciferasa de la luciérnaga (FIG. 3A). A efectos comparativos, se clonaron 4 copias de las secuencias potenciadoras del MMV y 2 copias del potenciador del MMV y 2 copias del promotor de SCBV corriente arriba del promotor Adh1 truncado de maíz y se fusionaron con el gen de luciferasa de la luciérnaga (FIG. 3A). Estos constructos fueron bombardeados en células Hi-II del maíz en suspensión junto con el constructo indicador UBI::GUS. Según se muestra en la FIG. 3B, los constructos que contienen 1, 2 y 4 copias del potenciador de SCBV tenían más de 5 veces, 6 veces y 10 veces más actividad, respectivamente, que las células bombardeadas con el constructo de Adh1 truncado sin ningún potenciador. El constructo 4X MMV tenía 2,5 veces la actividad del constructo Adh1 truncado y el constructo 2X MMV 2X SCBV tenía 6 veces la actividad del constructo Adh1 truncado.
- 20 La **FIG. 4** muestra la acumulación de transcritos cercanos ("gen flanqueante") al sitio de integración del 4XSCBV en plantas transgénicas (T) en comparación con plantas de control no transgénicas (W), analizada usando transcripción inversa y PCR (RT-PCR). Con fines comparativos, se muestra el nivel del gen GAPDH de mantenimiento. El potenciador del 4XSCBV causó una mayor acumulación de transcritos de genes cerca del lugar en el que se integra; este aumento en la acumulación de transcritos probablemente sea resultado de una mayor tasa de transcripción.
- 25
- 30
- 35

Listado de secuencias

- Las secuencias de ácidos nucleicos y/o aminoácidos enumeradas en el posterior listado de secuencias son mostradas usando abreviaturas estándar de letras para las bases de nucleótidos, y un código de tres letras para los aminoácidos, según se define en 37 C.F.R. 1.822. Solo se muestra una cadena de cada ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena mostrada. Las secuencias de ácidos nucleicos (en el listado de secuencias o en otros lugares de la presente memoria) son presentados en la dirección estándar de 5' a 3', y las secuencias de proteínas están presentadas en la dirección estándar terminal amino (N) a terminal carboxi (C).
- 40
- 45 La **SEQ ID NO: 1** muestra la secuencia de ácidos nucleicos del promotor de SCBV (correspondiente a las posiciones 6758-7596 del nº de acceso AJ277091.1 de GenBank, "Sugarcane bacilliform IM virus complete genome, isolate Ireng Maleng", que se incorpora a la presente memoria por referencia en su integridad según aparecía en línea el 15 de abril de 2010).
- 50 Los elementos potenciadores descritos en la presente memoria van de la posición 337 a la posición 618 de la SEQ ID NO: 1.

Descripción detallada*I. Abreviaturas*

3' UTR	región no traducida 3'
5' UTR	región no traducida 5'
Adh1	alcohol deshidrogenasa 1
ARNas	ARN antisentido
ADNc	ADN complementario
ARNbc	ARN bicatenario
GAPDH	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
KB	kilobytes
kpb	kilopares base
LUC	luciferasa
miARN	microARN
nt	nucleótido
ORF	marco abierto de lectura
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	transcripción inversa y PCR
SCBV	virus baciliforme de la caña de azúcar
ARNip	ARN interferente pequeño
ARNmc	ARN monocatenario
T _m	punto térmico de fusión
UTR	región no traducida

II. Términos

5 A no ser que se indique algo distinto, los términos técnicos se usan según el uso convencional. Se pueden encontrar definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (ed.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

10 Para facilitar la reseña de las diversas realizaciones de la invención, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

15 **5' y/o 3'**: Se dice que las moléculas de ácidos nucleicos (tales como el ADN y el ARN) tienen "**extremos 5'**" y "**extremos 3'**" porque se hace que mononucleótidos reaccionen para formar polinucleótidos de tal manera que el fosfato 5' de un anillo de pentosa de mononucleótidos está unido al oxígeno 3' de su vecino en una dirección mediante un enlace de fosfodiéster. Por lo tanto, se denomina a un extremo de un polinucleótido "extremo 5'" cuando su fosfato 5' no está enlazado con el oxígeno 3' de un anillo de pentosa de mononucleótidos. El otro extremo de un polinucleótido es denominado "extremo 3'" cuando su oxígeno 3' no está enlazado con un fosfato 5' de otro anillo de pentosa de mononucleótidos. A pesar de que un fosfato 5' de un anillo de pentosa de mononucleótidos esté unido al oxígeno 3' de su vecino, también se puede decir que una secuencia interna de ácidos nucleicos tiene extremos 5' y 3'.

20 En una molécula de ácido nucleico, ya sea lineal o circular, se dice que los elementos internos diferenciados están "**corriente arriba**" o 5' de los elementos "**corriente abajo**" o 3'. En relación con el ADN, esta terminología refleja que la transcripción procede en una dirección de 5' a 3' a lo largo de una cadena de ADN. Generalmente, los elementos promotores y potenciadores, que dirigen la transcripción de un gen ligado, están situados 5' o corriente arriba de la región codificante. Sin embargo, los elementos potenciadores pueden ejercer su efecto incluso cuando
25 están situados 3' del elemento promotor y de la región codificante. Las señales de terminación de la transcripción y poliadenilación están situadas 3' o corriente abajo de la región codificante.

Rasgo agronómico: Las características de una planta, características que incluyen, sin limitación, morfología, fisiología, crecimiento y desarrollo, producción, potenciación nutricional, resistencia a las enfermedades o a las plagas, o tolerancia medioambiental o química de la planta, son rasgos agronómicos. Un "rasgo agronómico mejorado" se refiere a una mejora medible en un rasgo agronómico, incluyendo, sin limitación, mayor producción, incluyendo mayor producción en condiciones no sujetas a estrés y una mayor producción en condiciones de estrés medioambiental. Las condiciones de estrés pueden incluir, por ejemplo, sequía, umbría, una enfermedad fúngica, una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana, una infestación por insectos, una infestación por nematodos, exposición a temperaturas frías, exposición al calor, estrés osmótico, disponibilidad reducida de nutrientes nitrogenados, disponibilidad reducida de nutrientes fosforosos y densidad elevada de las plantas. La "producción" puede verse afectada por muchas propiedades, incluyendo, sin limitación, la altura de la planta, el número de vainas en la planta, la posición de las vainas en la planta, el número de entrenudos, la incidencia del desgrane, el tamaño del grano, la eficacia de la nodulación y la fijación del nitrógeno, la eficacia en la asimilación de nutrientes, la resistencia al estrés biótico y al abiótico, la asimilación del carbono, la arquitectura de la planta, la resistencia al
35

encamado, el porcentaje de germinación de las semillas, el vigor de las plantas de semillero y los rasgos juveniles. La producción también puede verse afectada por la eficacia de la germinación (incluyendo la germinación en condiciones de estrés), la tasa de crecimiento (incluyendo la tasa de crecimiento en condiciones de estrés), el número de espigas, el número de semillas por espiga, el tamaño de la semilla, la composición de las semillas (fécula, aceite, proteína) y las características del terreno en el que se siembra. Puede haber una mayor producción por la utilización mejorada de compuestos bioquímicos clave, tales como nitrógeno, fósforo e hidratos de carbono, o por respuestas mejoradas a causas de estrés medioambiental, tales como frío, calor, sequía, sal y ataques por plagas o patógenos. El ADN recombinante usado en esta divulgación también puede ser usado para proporcionar plantas que tengan un crecimiento y un desarrollo mejores, y, en último término, mayor producción, como resultado de la expresión modificada de reguladores del crecimiento vegetal o de la modificación del ciclo celular o de los sistemas de la fotosíntesis. En la presente memoria se proporcionan ejemplos adicionales de rasgos agronómicos y de la alteración de tales rasgos en las plantas y/o estos serán reconocidos por las personas con un dominio normal de la técnica.

Alteraciones: Las alteraciones en un polinucleótido (por ejemplo, un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la presente invención), según se usa este término en la presente memoria, comprenden cualquier delección, inserción y mutación puntual en la secuencia del polinucleótido. Se encuentran incluidas en esta definición las alteraciones a la secuencia de ADN genómico que codifica el polipéptido. Asimismo, se puede usar el término "alteración" para referirse a delecciones, inserciones y otras mutaciones en secuencias de polipéptidos.

Alteración del nivel de producción o expresión: Cambiar, ya sea aumentando o disminuyendo, el nivel de producción o expresión de una molécula de ácido nucleico o una molécula de aminoácido (por ejemplo, un ARNip, un miARN, un ARNm, un gen, un polipéptido, un péptido), con respecto a un nivel de control de producción o expresión.

Amplificación: Cuando se usa con referencia a un ácido nucleico, esta se refiere a técnicas que aumentan el número de copias de una molécula de ácido nucleico en una muestra o espécimen. Un ejemplo de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa, en la que una muestra biológica tomada de un sujeto es puesta en contacto con un par de cebadores de oligonucleótidos, en condiciones que permiten la hibridación de los cebadores con la plantilla de ácidos nucleicos de la muestra. Los cebadores son extendidos en condiciones adecuadas, desasociados de la plantilla y luego rehibridados, extendidos y desasociados para amplificar el número de copias del ácido nucleico. El producto de la amplificación *in vitro* puede ser caracterizado por electroforesis, patrones de restricción de escisión de la endonucleasa, hibridación o ligadura de oligonucleótidos y/o secuenciación de ácidos nucleicos, usando técnicas estándar. Otros ejemplos de técnicas de amplificación *in vitro* incluyen la amplificación por desplazamiento de las cadenas (véase la patente estadounidense nº 5.744.311); la amplificación isotérmica sin transcripción (véase la patente estadounidense nº 6.033.881); la amplificación por reacción en cadena de reemparejamiento (véase el documento WO 90/01069); la amplificación por reacción en cadena por la ligasa (véase el documento EP-A-320 308); la amplificación por reacción en cadena por ligasa con llenado de huecos (véase la patente estadounidense nº 5.427.930); la detección de la ligasa y PCR acopladas (véase la patente estadounidense nº 6.027.889); y la amplificación NASBA™ de ARN sin transcripción (véase la patente estadounidense nº 6.025.134).

Antisentido, sentido y antígeno: El ADN tiene dos cadenas antiparalelas, una cadena 5' → 3', denominada cadena positiva, y una cadena 3' → 5', denominada cadena negativa. Dado que la ARN polimerasa añade ácidos nucleicos en la dirección 5' → 3', la cadena negativa del ADN sirve de plantilla para el ARN durante la transcripción. Así, un transcrito de ARN tendrá una secuencia complementaria de la cadena negativa, e idéntica a la cadena positiva (salvo que T es sustituida por U).

Moléculas antisentido son moléculas que son específicamente hibridizables o específicamente complementarias ya sea al ARN o a la cadena positiva del ADN. Moléculas sentido son moléculas que son específicamente hibridizables o específicamente complementarias a la cadena negativa del ADN. Moléculas antígeno son moléculas ya sea antisentido o sentido dirigidas a una diana de ADN. Un ARN antisentido (ARNas) es una molécula de ARN complementaria de una molécula de ácido nucleico sentido (codificante).

Inhibición antisentido: Esta expresión se refiere a una clase de regulación de genes basada en la inhibición citoplasmática, nuclear o de orgánulos de la expresión génica (por ejemplo, la expresión del genoma de la célula anfitriona o del genoma de un patógeno, tal como un virus) debida a la presencia, en una célula, de una molécula de ARN complementaria de al menos una porción del ARNm que está siendo traducida.

ADNc (ADN complementario): Un trozo de ADN que carece de segmentos internos no codificantes (intrones) y de secuencias reguladoras transcripcionales. El ADNc también puede contener regiones no traducidas (UTR) que son responsables del control de la traducción en la correspondiente molécula de ARN. El ADNc suele sintetizarse en el laboratorio mediante transcripción inversa a partir de ARN mensajero extraído de células o de otras muestras.

Quimérico o quimera: El producto de la fusión de porciones de dos o más moléculas de polinucleótidos o péptidos diferentes. Por ejemplo, las expresiones "secuencia quimérica" y "gen quimérico" se refieren a secuencias de nucleótidos derivadas de al menos dos partes heterólogas. La secuencia quimérica puede comprender ADN o ARN.

Región quimérica reguladora de la transcripción: Un conjunto de secuencias de control o reguladoras de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico operativamente ligado al mismo, conjunto que se ensambla a partir de diferentes fuentes de polinucleótidos. Por ejemplo, las regiones quiméricas reguladoras de la transcripción descritas en la presente memoria pueden ser producidas mediante manipulación de promotores conocidos o de otras moléculas de polinucleótidos. Las regiones quiméricas reguladoras de la transcripción pueden combinar dos o más dominios potenciadores con uno o más promotores, fusionando, por ejemplo, un dominio potenciador heterólogo de un primer promotor nativo a un segundo promotor con su propio conjunto parcial o completo de uno o varios elementos reguladores. Esta divulgación proporciona, *inter alia*, regiones quiméricas reguladoras de la transcripción que contienen al menos un dominio potenciador de SCBV fusionado (es decir, operativamente ligado) con un promotor activo en una o varias plantas.

Constructo: Cualquier molécula recombinante de polinucleótidos, tal como un plásmido, un cósmido, un virus, una molécula de polinucleótidos que se duplique de manera autónoma, un fago o una molécula de polinucleótidos de ADN o ARN monocatenaria o bicatenaria lineal o circular, derivada de cualquier fuente, capaz de integración genómica o duplicación autónoma, que comprenda una molécula de polinucleótidos en la que han quedado operativamente ligadas una o más moléculas de polinucleótidos transcribibles.

Planta de control: Como referencia comparativa, se usa una planta que no contiene un ADN recombinante que confiera (por ejemplo) un rasgo agronómico mejorado o alterado en una planta transgénica; por ejemplo, para identificar un rasgo agronómico mejorado o alterado en la planta transgénica. Una planta de control adecuada puede ser una planta no transgénica de la línea parental usada para generar una planta transgénica, o una planta que, al menos, sea no transgénica para el rasgo particular objeto de estudio (es decir, la planta de control puede haber sido diseñada para que contenga otras secuencias heterólogas o moléculas de ADN recombinante). Así, una planta de control puede ser, en algunos casos, una línea de plantas transgénicas que comprenda un vector o gen marcador vacío pero que no contiene el ADN recombinante, o no contiene todos los ADN recombinantes en la planta de ensayo.

Cosupresión: La expresión de un gen foráneo (heterólogo) que tiene homología sustancial con un gen endógeno, resultando en la supresión de la expresión tanto del gen foráneo como el endógeno.

ADN (ácido desoxirribonucleico): El ADN es un polímero de cadena larga que comprende el material genético de la mayoría de organismos (algunos virus tienen genes que comprenden ácido ribonucleico (ARN)). Las unidades que se repiten en los polímeros de ADN son cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales comprende una de cuatro bases —adenina, guanina, citosina y timina— unidas a un azúcar de desoxirribosa al cual está unido un grupo fosfato. Tripletes de nucleótidos (denominados codones) codifican cada aminoácido de un polipéptido, o una señal de parada. También se usa el término codón para las secuencias correspondientes (y complementarias) de tres nucleótidos en el ARNm al que se transcribe la secuencia de ADN.

A no ser que se especifique algo distinto, cualquier referencia a una molécula de ADN incluye el complemento inverso de esa molécula de ADN. Salvo cuando el texto de la presente memoria requiere una condición monocatenaria, las moléculas de ADN, aunque estén escritas representando una sola cadena, abarcan ambas cadenas de una molécula bicatenaria de ADN.

Codificar: Se dice que un polinucleótido codifica un polipéptido si, en su estado nativo o cuando es manipulado por métodos conocidos para los expertos en la técnica, la molécula del polinucleótido puede ser transcrita y/o traducida para producir un ARNm para el polipéptido y/o para un fragmento del mismo. La cadena antisentido es el complemento de tal ácido nucleico, y la secuencia de codificación puede ser deducida del mismo.

Dominio potenciador: Un elemento regulador transcripcional que actúa en *cis* (también denominado elemento *cis*) que confiere un aspecto de control total de la expresión génica. Un dominio potenciador puede funcionar para unir factores de transcripción, que son factores proteínicos que actúan en *trans* que regulan la transcripción. Algunos dominios potenciadores unen más de un factor de transcripción, y los factores de transcripción pueden interactuar con afinidades diferentes con más de un dominio potenciador. Los dominios potenciadores pueden ser identificados mediante varias técnicas, incluyendo el análisis por delección (eliminar uno o más nucleótidos del extremo 5' o internos a un promotor); análisis de proteínas de unión a ADN usando ensayos de obtención de la impronta de la desoxirribonucleasa I, de interferencia de metilación y de cambio de la movilidad en electroforesis, obtención de la impronta genómica *in vivo* mediante PCR arbitrada por ligación y otros ensayos convencionales; o por comparación de secuencias de ADN con motivos de elementos *cis* conocidos usando métodos convencionales de comparación de secuencias de ADN. La estructura fina de un dominio potenciador puede ser estudiada, además, por mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o por otros métodos convencionales. Pueden obtenerse dominios potenciadores mediante síntesis química o por aislamiento con respecto a los promotores que incluyen tales elementos, y pueden ser sintetizados con nucleótidos flanqueantes adicionales que contienen sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar la manipulación de subsecuencias.

Expresión (de un gen): Transcripción de una molécula de ADN a una molécula de ARN transcrita. Más en general, los procedimientos mediante los cuales la información codificada de un gen se convierte en las estructuras presentes y que operan en la célula. Los genes expresados incluyen los que son transcritos al ARNm y luego

traducidos a proteína, y los que son transcritos a ARN pero no traducidos a proteína (por ejemplo, ARNip, ARN de transferencia y ARN ribosómico). Así, la expresión de una secuencia diana, tal como un gen o una región promotora de un gen, puede dar como resultado la expresión de un ARNm, una proteína o ambos. La expresión de la secuencia diana puede ser inhibida o potenciada (disminuida o aumentada). Se puede describir que la expresión génica está relacionada con cualidades temporales, espaciales, de desarrollo o morfológicas, así como a indicaciones cuantitativas o cualitativas.

Actividad reguladora de un gen: La capacidad de un polinucleótido de afectar a la transcripción o la traducción de una molécula de polinucleótido transcribible o traducible ligada operativamente. Una molécula de un polinucleótido aislado que tenga actividad reguladora de un gen puede proporcionar expresión temporal o espacial o modular niveles y tasas de expresión de la molécula de polinucleótido transcribible operativamente ligada. Una molécula de un polinucleótido aislado que tenga actividad reguladora de un gen puede incluir un promotor, un intrón, un líder o una región de terminación de la transcripción 3'.

Silenciamiento de un gen: El silenciamiento de un gen se refiere a la ausencia (o reducción) de la expresión génica como consecuencia, aunque sin limitación, a los efectos de un nivel genómico (de ADN) tal como la reestructuración de la cromatina, o al nivel postranscripcional a través de efectos en la estabilidad o la traducción del transcrito. La evidencia actual sugiere que la interferencia por ARN (iARN) es un proceso primordial implicado en el silenciamiento transcripcional y postranscripcional de un gen.

Dado que la iARN ejerce sus efectos en el ámbito transcripcional y postranscripcional, se cree que la iARN puede ser usada para inhibir específicamente transcritos alternativos del mismo gen.

Heteróloga: Un tipo de secuencia que normalmente no se halla (por ejemplo, en la secuencia de la forma natural) adyacente a una segunda secuencia. En una realización, la secuencia es de una fuente genética —tal como un virus, un organismo o una especie— diferente de la segunda secuencia.

Hibridación: Los oligonucleótidos y sus análogos se hibridan mediante un enlace de hidrógeno, que incluye el enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso, entre bases complementarias. Generalmente, el ácido nucleico consiste en bases nitrogenadas que son bien pirimidinas (citosina (C), uracilo (U) y timina (T)) o bien purinas (adenina (A) y guanina (G)). Estas bases nitrogenadas forman enlaces de hidrógeno entre una pirimidina y una purina, y el enlace de la pirimidina a la purina es denominado **emparejamiento de bases**. Más específicamente, A tendrá un enlace de hidrógeno con T o U, y G se enlazarán con C. En las moléculas de ARN, G también se enlazarán con U. **Complementario** se refiere al emparejamiento de bases que se produce entre dos secuencias diferenciadas de ácidos nucleicos o dos regiones diferenciadas de la misma secuencia de ácidos nucleicos.

Las condiciones de hibridación que dan como resultado grados particulares de rigor variarán dependiendo de la naturaleza del método preferido de hibridación y de la composición y la longitud de las secuencias de ácidos nucleicos hibridantes. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na⁺) del tampón de hibridación determinarán el rigor de la hibridación. Los cálculos relativos a las condiciones de hibridación requeridas para lograr grados particulares de rigor son presentados por Sambrook *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, capítulos 9 y 11, incorporados por referencia a la presente memoria.

El siguiente es un conjunto ejemplar de condiciones de hibridación y no se pretende que sea limitante.

Rigor altísimo (detecta secuencias que comparten una identidad de secuencias del 90%)

Hibridación: 5× SSC a 65°C durante 16 horas
 Lavar dos veces: 2× SSC a temperatura ambiente (TA) durante 15 minutos cada vez
 Lavar dos veces: 0,5× SSC a 65°C durante 20 minutos cada vez

Rigor alto (detecta secuencias que comparten una identidad de secuencias del 80% o mayor)

Hibridación: 5×-6× SSC a 65°C-70°C durante 16-20 horas
 Lavar dos veces: 2× SSC a TA durante 5-20 minutos cada vez
 Lavar dos veces: 1× SSC a 55°C-70°C durante 30 minutos cada vez

Rigor bajo (detecta secuencias que comparten una identidad de secuencias superior al 50%)

Hibridación: 6× SSC a TA to 55°C durante 16-20 horas
 Lavar al menos dos veces: 2×-3× SSC a TA hasta 55°C durante 20-30 minutos cada vez.

En cis: Indica que dos secuencias están situadas en el mismo trozo de ARN o ADN.

En trans: Indica que dos secuencias están situadas en trozos diferentes de ARN o ADN.

Cultivo industrial: Cultivos explotados fundamentalmente para ser consumidos por seres humanos o animales o para ser usados en procesos industriales (por ejemplo, como fuente de ácidos grasos para la fabricación de azúcares para producir alcohol). Se entenderá que, en muchos casos, puede consumirse ya sea la planta o un producto producido a partir de la planta (por ejemplo, edulcorantes, aceite, harina o maicena); así, un subconjunto de cultivos industriales son cultivos alimentarios. Ejemplos de cultivos alimentarios incluyen, sin limitación, plantas de maíz, soja, arroz, trigo, colza, algodón, avena, cebada y patata. En la presente memoria se enumeran otros ejemplos de cultivos industriales (incluyendo cultivos alimentarios).

Inhibir o interferir en (expresión de una secuencia diana): Esta frase se refiere a la capacidad de un ARN pequeño, tal como un ARNip o un miARN, o de otra molécula, de reducir de forma cuantificable la expresión y/o la estabilidad de las moléculas que contienen la secuencia diana. Una secuencia diana puede incluir una secuencia de ADN, tal como un gen o la región promotora de un gen, o una secuencia de ARN, tal como un ARNm. La expresión "Inhibir o interferir en" contempla la reducción del producto final del gen o la secuencia; por ejemplo, la expresión o función de la proteína codificada, o una proteína, un ácido nucleico, otra biomolécula o una función biológica influidos por la secuencia diana, e incluye así la reducción en la cantidad o la longevidad del transcrito de ARNm o de otra secuencia diana. En algunas realizaciones, el ARN pequeño u otra molécula guía las modificaciones de la cromatina que inhiben la expresión de una secuencia diana. Se entiende que la frase es relativa, y no requiere la inhibición absoluta (supresión) de la secuencia. Así, en ciertas realizaciones, inhibir o interferir en la expresión de una secuencia diana requiere que, tras la aplicación del ARN pequeño o de otra molécula (tal como un vector u otro constructo que codifique uno o más ARN pequeños), la secuencia sea expresada al menos un 5% menos que antes de la aplicación, al menos un 10% menos, al menos un 15% menos, al menos un 20% menos, al menos un 25% menos, o esté más reducida aún. Así, en algunas realizaciones particulares, la aplicación de un ARN pequeño u otra molécula reduce la expresión de la secuencia diana en aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, o más. En ejemplos específicos en los que el ARN pequeño u otra molécula es particularmente eficaz, la expresión se reduce en un 70%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, o incluso más.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico, un péptido o una proteína) ha sido sustancialmente separado, producido aparte o purificado alejado de otros componentes biológicos de la célula del organismo en el que se presenta el componente de forma natural; por ejemplo, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, y proteínas. Los ácidos nucleicos, péptidos y proteínas que han sido "aislados" incluyen, así, ácidos nucleicos y proteínas purificados por métodos estándar de purificación. El término también abarca ácidos nucleicos, péptidos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula anfitriona, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

Metaboloma: El complemento de moléculas (metabolitos) de peso molecular relativamente bajo que está presente en un único organismo, una muestra, un tejido, una célula o cualquier otra división divisible. A título de ejemplo, los metabolomas pueden incluir intermediarios metabólicos, hormonas y otras moléculas de señalización y metabolitos secundarios. Metabolomas representativos comprenden el complemento de metabolitos hallados en una muestra biológica, tal como una planta, o una muestra de planta, o en una suspensión o un extracto de la misma. Ejemplos de tales moléculas incluyen, sin limitación: ácidos y compuestos afines; ácidos mono, di y tricarboxílicos (arilos y alcarilos saturados, insaturados, alifáticos y cíclicos); aldoácidos, cetoácidos; formas de lactona; giberelinas; ácido abscísico; alcoholes, polioles, derivados y compuestos afines; alcohol etílico, alcohol bencílico, metanol; propilenglicol, glicerol, fitol; inositol, alcohol furfurílico, mentol; aldehídos, cetonas, quinonas, derivados y compuestos afines; acetaldehído, butiraldehído, benzaldehído, acroleína, furfural, glioxal; acetona, butanona; antraquinona; hidratos de carbono; mono, di, trisacáridos; alcaloides, aminas y otras bases; piridinas (incluyendo ácido nicotínico y nicotinamida); pirimidinas (incluyendo citidina y timina); purinas (incluyendo guanina, adenina, xantinas/hipoxantinas y kinetina); pirroles; quinolinas (incluyendo isoquinolinas); morfina, tropanos, quinquinanos; nucleótidos, oligonucleótidos, derivados y compuestos afines; guanosina, citosina, adenosina, timidina, inosina; aminoácidos, oligopéptidos, derivados y compuestos afines; ésteres; fenoles y compuestos afines; compuestos heterocíclicos y derivados; pirroles, tetrapirroles (corrinoídes y porfirinas/porfirinas, emulsiones de iones metálicos w/w/o); flavonoides; indoles; lípidos (incluyendo ácidos grasos y triglicéridos), derivados y compuestos afines; carotenoides, fitoeno; y esteroides, isoprenoides, incluyendo terpenos.

MicroARN (miARN): Productos de genes de ARN pequeño no codificante de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud y encontrados en diversos organismos, incluyendo animales y plantas. Los miARN se asemejan estructuralmente a los ARNip, salvo en que surgen de transcritos precursores estructurados formadores de ahorquillamientos derivados de genes de miARN. Los transcritos primarios de genes de miARN forman estructuras en horquilla que son procesadas por la nucleasa multidominio de tipo ribonucleasa III DICER y DROSHA (en animales) o ANÁLOGO DE DICER 1 (DCL1; en plantas) para producir dobles cadenas de miARN. El miARN maduro se incorpora en complejos RISC después del desenrollado de la doble cadena. Los miARN vegetales interactúan con sus dianas de ARN con complementariedad perfecta o casi perfecta.

Nucleótido: El término nucleótido incluye, sin limitación, un monómero que incluye una base ligada a un azúcar, tal como una pirimidina, una purina o análogos sintéticos de las mismas, o una ligada a un aminoácido, como en un ácido peptidoneurónico (APN). Un nucleótido es un monómero en un oligonucleótido/polinucleótido. Una secuencia de nucleótidos se refiere a la secuencia de bases en un oligonucleótido/polinucleótido.

Los nucleótidos fundamentales del ADN son desoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP o A), desoxiguanosina 5'-trifosfato (dGTP o G), desoxicitidina 5'-trifosfato (dCTP o C) y desoxitimidina 5'-trifosfato (dTTP o T). Los nucleótidos fundamentales del ARN son adenosina 5'-trifosfato (ATP o A), guanosina 5'-trifosfato (GTP o G), citidina 5'-trifosfato (CTP o C) y uridina 5'-trifosfato (UTP o U). La inosina es también una base que puede integrarse en el ADN o el ARN en un nucleótido (dITP o ITP, respectivamente).

Especies (vegetales) oleícolas: Especies vegetales que producen y almacenan triacilglicerol en órganos específicos, fundamentalmente en semillas. Tales especies incluyen, sin limitación, soja (*Glycine nizam*), colza y canola (tal como *Brassica napus*, *Brassica rapa* y *Brassica campestris*), girasol (*Helianthus annuus*), algodón (*Gossypium hirsutum*), maíz (*Zea mays*), cacao (*Theobroma cacao*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), palma aceitera (*Elaeis guineensis*), palma cocotera (*Cocos nucifera*), lino (*Linum usitatissimum*), ricino (*Ricinus communis*) y cacahuete (*Arachis hypogaea*).

Oligonucleótido: Un oligonucleótido es una pluralidad de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 300 nucleótidos en longitud. Un análogo de oligonucleótido se refiere a compuestos que actúan de forma similar a los oligonucleótidos, pero tienen porciones que no se dan de forma natural. Por ejemplo, los análogos de oligonucleótidos pueden contener porciones que no se dan de forma natural, tales como restos de azúcares alterados o enlaces entre azúcares, tales como un fosforotioato oligodesoxinucleótido. Los análogos funcionales de polinucleótidos que se presentan de forma natural pueden enlazarse con el ARN o el ADN.

Operativamente ligado: Esta expresión se refiere a una yuxtaposición de componentes, particularmente secuencias de nucleótidos, de modo que la función normal de los componentes se pueda llevar a cabo. Así, una primera secuencia de ácidos nucleicos está operativamente ligada con una segunda secuencia de ácidos nucleicos cuando la primera secuencia de ácidos nucleicos es puesta en una relación funcional con la segunda secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor está operativamente ligado con una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o a la expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN operativamente ligadas son contiguas y, cuando ello es necesario para unir dos regiones codificantes de proteínas, se encuentran en el mismo marco de lectura. Una secuencia codificante que está "operativamente ligada" a una o varias secuencias reguladoras se refiere a una configuración de secuencias de nucleótidos, pudiendo expresarse la secuencia codificante bajo el control regulador (por ejemplo, control de transcripción y/o de traducción) de las secuencias reguladoras.

ORF (marco abierto de lectura): Una serie de tripletes (codones) de nucleótidos que codifican aminoácidos sin ningún codón de terminación. Estas secuencias suelen ser traducibles formando un péptido.

Identidad porcentual de secuencias: El porcentaje de nucleótidos idénticos en una secuencia lineal de polinucleótidos de una molécula de polinucleótidos de referencia ("consulta") (o de su cadena complementaria), a diferencia de una molécula de polinucleótidos de ensayo ("sujeto") (o de su cadena complementaria), cuando las dos secuencias están óptimamente alineadas (con inserciones, deleciones apropiadas de nucleótidos o huecos que totalicen menos del 20 por ciento de la secuencia de referencia con respecto a la ventana de comparación). El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación es muy conocido para los expertos en la técnica y puede llevarse a cabo usando herramientas tales como el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, o el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman. Tales comparaciones se llevan a cabo, preferentemente, usando las implementaciones informatizadas de estos algoritmos, tales como GAP, BESTFIT, PASTA y TFASTA, disponibles como parte del GCG® Wisconsin Package® (Accelrys Inc., Burlington, Massachusetts). Una "fracción de identidad" para segmentos alineados de una secuencia de ensayo y una secuencia de referencia es el número de componentes idénticos que son compartidos por dos secuencias alineadas dividido por el número total de componentes en el segmento de la secuencia de referencia (es decir, toda la secuencia de referencia o una parte definida menor de la secuencia de referencia). La identidad porcentual de secuencias se representa como la fracción de identidad multiplicada por 100. La comparación de una o más secuencias de polinucleótidos puede ser con una secuencia de polinucleótidos de longitud máxima o con una porción de la misma, o con una secuencia de polinucleótidos más larga. La **identidad sustancial porcentual de secuencias** es una identidad de secuencias de al menos aproximadamente el 80%, una identidad de secuencias de al menos aproximadamente el 90%, o una identidad de secuencias aun mayor, tal como una identidad de secuencias de aproximadamente el 98% o aproximadamente el 99%.

Planta: Cualquier planta y la progenie de la misma. El término también incluye partes de plantas, incluyendo la semilla, esquejes, tubérculos, el fruto, flores, etc. En diversas realizaciones, el término planta se refiere a especies vegetales cultivadas, tales como maíz, algodón, canola, girasol, soja, sorgo, alfalfa, trigo, arroz, plantas frutícolas y verduras, y el césped y especies vegetales ornamentales. La expresión **célula vegetal**, usada en la presente memoria, se refiere a la unidad estructural y fisiológica de las plantas, consistente en un protoplasto y la pared circular circundante. La expresión **órgano vegetal**, usada en la presente memoria, se refiere a una parte definida y visiblemente diferenciada de una planta, tal como la raíz, el tallo, la hoja o el embrión.

Más en general, la expresión **tejido vegetal** se refiere a cualquier tejido de una planta *in planta* o en cultivo. Esta expresión incluye una planta entera, una célula vegetal, un órgano vegetal, un protoplasto, un cultivo celular, o cualquier grupo de células vegetales organizadas en una unidad estructural y funcional.

5 **Molécula de polinucleótidos:** ADN o ARN mono o bicatenarios de origen genómico o sintético; es decir, un polímero de bases desoxirribonucleótidas o ribonucleótidas, respectivamente, leído desde el extremo 5' (corriente arriba) al extremo 3' (corriente abajo).

10 **Molécula de polipéptidos:** Un polímero en el que los monómeros son residuos de aminoácidos que están unidos entre sí a través de enlaces de amida. Cuando los aminoácidos son aminoácidos alfa, puede usarse ya sea el isómero óptico L o el isómero óptico D, prefiriéndose los isómeros L. El término polipéptido o proteína, usado en la presente memoria, abarca cualquier secuencia de aminoácidos e incluye secuencias modificadas tales como glucoproteínas. El término polipéptido está concebido específicamente para abarcar las proteínas que se dan de forma natural, así como las que son producidas de forma recombinante o sintética.

15 **Silenciamiento postranscripcional de genes (PTGS):** Una forma de silenciamiento de genes en la que el mecanismo inhibidor se produce después de la transcripción. Esto puede dar como resultado ya sea un nivel reducido del estado estacionario de una diana específica de ARN o una inhibición de la traducción (Tuschl, *ChemBiochem*, 2: 239-245, 2001). En la bibliografía, las expresiones interferencia por ARN (iARN) y cosupresión postranscripcional se usan a menudo para indicar el silenciamiento postranscripcional de genes.

20 **Promotor:** Un conjunto de secuencias de control de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico, mediante el reconocimiento y el enlace, por ejemplo, con la ARN polimerasa II y otras proteínas (factores de transcripción que actúan en *trans*) para iniciar la transcripción. Un promotor incluye las secuencias necesarias de ácidos nucleicos cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Mínimamente, un promotor incluye normalmente al menos un sitio de unión de la ARN polimerasa y también puede incluir uno o más sitios de unión del factor de transcripción, que modulan la transcripción en respuesta a la ocupación por factores de transcripción. En la presente memoria se describen ejemplos representativos de promotores (y de elementos que pueden ser ensamblados para producir un promotor). Los promotores pueden definirse por su patrón de expresión temporal, espacial o de desarrollo.

Un promotor vegetal es un promotor nativo o no nativo que es funcional en las células vegetales.

Proteína: Una molécula biológica —por ejemplo, un polipéptido—, expresada por un gen y constituida por aminoácidos.

30 **Protoplasto:** Una célula vegetal aislada sin pared celular, que tiene el potencial de ser transformada y/o de regeneración en un cultivo celular o en una planta completa.

35 **Purificado:** El término "purificado" no requiere absoluta pureza; está pensado, más bien, como un término relativo. Así, por ejemplo, una preparación purificada de una proteína de fusión es aquella en la que la proteína de fusión está más enriquecida que la proteína en su entorno generativo; por ejemplo, dentro de una célula o en una cámara de reacción bioquímica. Preferentemente, una preparación de una proteína de fusión es purificada de modo que la proteína de fusión represente al menos el 50% del contenido proteínico total de la preparación.

40 **Recombinante:** Un ácido nucleico recombinante es aquel que tiene una secuencia que no se da de forma natural o que tiene una secuencia que está hecha mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencias separados en otros casos. Esta combinación artificial se logra a menudo mediante síntesis química o, más comúnmente, por manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética.

De manera similar, una proteína recombinante es aquella codificada por una molécula de ácido nucleico recombinante.

45 **Promotor regulable:** Un promotor cuya actividad es regulada (directa o indirectamente) por un agente, tal como un factor de transcripción, un compuesto químico, una condición ambiental o una molécula de ácido nucleico.

50 **Regulación de la expresión génica:** Procesos de control de la expresión de un gen aumentando o disminuyendo la expresión, la producción o la actividad de un agente que afecta a la expresión génica. El agente puede ser una proteína, tal como un factor de transcripción, una molécula de ácido nucleico, tal como un miARN o una molécula de ARNip, que, cuando está en contacto con el gen o con sus secuencias reguladoras corriente arriba, o con un ARNm codificado por el gen, aumenta o disminuye la expresión génica.

55 **Secuencias o elementos reguladores:** Estos términos se refieren generalmente a una clase de moléculas de polinucleótidos (tales como moléculas de ADN, que tienen secuencias de ADN) que controlan o influyen en la transcripción o la traducción de una molécula de polinucleótido transcribible ligada operativamente y, con ello, en la expresión de los genes. En la expresión están incluidos promotores, potenciadores, líderes, intrones, regiones de control de *locus*, elementos límite/aisladores, silenciadores, regiones de unión a la matriz (también denominadas

regiones de unión al andamio), represores, terminadores transcripcionales (también denominados regiones de terminación de la transcripción), orígenes de replicación, centrómeros y puntos de gran actividad de recombinación meiótica. Los promotores son secuencias de ADN cerca del extremo 5' de un gen que actúan como sitio de unión para la ARN polimerasa, y a partir de las cuales se inicia la transcripción. Los potenciadores son elementos de control que elevan el nivel de transcripción a partir de un promotor, habitualmente de manera independiente de la orientación del potenciador o de la distancia del promotor. Las regiones de control de *locus* (LCR) confieren una expresión específica al tejido y temporalmente regulada a los genes a los que están ligadas. Las LCR actúan independientemente de su posición en relación con el gen, pero dependen del número de copias. Se cree que actúan abriendo la estructura del nucleosoma para que otros factores puedan unirse al ADN. Las LCR también pueden afectar a la temporización de replicación y al uso del origen. Los aisladores (también denominados elementos límite) son secuencias de ADN que impiden la activación (o la inactivación) de la transcripción de un gen bloqueando los efectos de la cromatina circundante. Los silenciadores y los represores son elementos de control que suprimen la expresión génica; actúan en un gen independientemente de su orientación o de su distancia del gen. Las regiones de unión a la matriz (MAR), también denominadas regiones de unión al andamio, son secuencias dentro del ADN que se unen al andamio nuclear. Pueden afectar a la transcripción, posiblemente separando los cromosomas en dominios reguladores. Se cree que las MAR arbitran estructuras de orden superior en forma de bucle dentro de los cromosomas. Los terminadores transcripcionales son regiones dentro de las inmediaciones del gen en el que la ARN polimerasa se libera de la plantilla. Los orígenes de replicación son regiones del genoma que, durante la síntesis del ADN o las fases de replicación de la división celular, empiezan el proceso de replicación del ADN. Los puntos de gran actividad de recombinación meiótica son regiones del genoma que se recombinan más frecuentemente que el promedio durante la meiosis. Los nucleótidos específicos dentro de una región reguladora pueden cumplir múltiples funciones. Por ejemplo, un nucleótido específico puede formar parte de un promotor y participar en la unión de una proteína activadora transcripcional.

Los elementos reguladores aislados que actúan en las células (por ejemplo, en plantas o células vegetales) son útiles para modificar fenotipos vegetales; por ejemplo, mediante ingeniería genética.

ARN: Un polímero normalmente lineal de monómeros de ácido ribonucleico, ligados por enlaces de fosfodiéster. Las moléculas de ARN que se presentan de forma natural se encuentran en tres clases generales: mensajero (ARNm, que codifica proteínas), ribosómico (ARNr, componentes de ribosomas) y de transferencia (ARNt, moléculas responsables de transferir monómeros de aminoácidos al ribosoma durante la síntesis de proteínas). El ARN mensajero incluye ARN nuclear heterogéneo (ARNnh) y polisómico asociado a membranas (unido al retículo endoplasmático rugoso). El ARN total se refiere a una mezcla heterogénea de todos los tipos de moléculas de ARN.

Interferencia por ARN (iARN): Los mecanismos de silenciamiento de genes que implican ARN pequeños (incluyendo miARN y ARNip) son denominados con frecuencia con el término general iARN. Las funciones naturales de la iARN incluyen la protección del genoma contra la invasión por elementos genéticos móviles tales como transposones y virus, y la regulación de la expresión génica.

La interferencia por ARN da como resultado la inactivación o supresión de la expresión de un gen en un organismo. La iARN puede ser desencadenada a través de una de dos rutas generales. En primer lugar, puede ser desencadenada por la distribución celular directa de ARN interferentes pequeños (ARNip, habitualmente de 21 nucleótidos de longitud y distribuidos en forma bicatenaria de ARNbc con dos nucleótidos no emparejados en cada extremo 3'), que tienen complementariedad de secuencias a un ARN que es la diana para la supresión. En segundo lugar, la iARN puede ser desencadenada por uno de varios métodos en los que los ARNip son formados *in vivo* a partir de diversos tipos de genes diseñados expresados. Estos genes normalmente expresan moléculas de ARN que forman dobles cadenas intra o intermoleculares (ARNbc) que son procesadas por enzimas naturales (DICER o DCL) para formar ARNip. En algunos casos, estos genes expresan transcritos de ARN que forman horquillas con un emparejamiento de bases perfecto o casi perfecto; algunos de los transcritos imperfectos formadores de horquillas producen un tipo especial de ARN pequeño, denominado microARN (miARN). En cualquiera de los dos métodos generales, precisamente los ARNip (o los miARN) que actúan como "secuencias guía" para dirigir una enzima degradadora del ARN (denominada RISC) para que escinda o silencie el ARN diana. En algunos casos, es beneficioso integrar un gen inductor de iARN en el genoma de un organismo transgénico. Un ejemplo sería una planta que es modificada para suprimir un gen específico mediante un transgén inductor de iARN. En la mayoría de los métodos que se practican en la actualidad, la iARN se desencadena en plantas transgénicas mediante transgenes que expresan un ARNbc (ya sea intramolecular o en horquilla, o intermolecular en el que dos transcritos se hibridan para formar ARNbc).

Silenciamiento de ARN: Expresión general que se usa para indicar silenciamiento de genes, o iARN, basado en ARN.

Identidad de secuencias: La similitud entre dos secuencias de ácidos nucleicos, o de dos secuencias de aminoácidos, se expresa en términos de la similitud entre las secuencias, también denominada identidad de secuencias. La identidad de secuencias se mide en términos de identidad (o similitud u homología) porcentual; cuanto mayor sea el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los homólogos de las secuencias referidas o divulgadas en la presente memoria, tales como los homólogos del elemento potenciador de SCBV, poseerán un grado relativamente alto de identidad de secuencias cuando son alineados usando métodos estándar.

Los métodos de alineamiento de secuencias para su comparación son muy conocidos en la técnica. Se describen diversos programas y algoritmos de alineamiento en: Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981); Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970); Pearson y Lipman (*PNAS. USA* 85: 2444, 1988); Higgins y Sharp (*Gene*, 73: 237-244, 1988); Higgins y Sharp (*CABIOS* 5: 151-153, 1989); Corpet *et al.* (*Nuc. Acids Res.* 16: 10881-90, 1988); Huang *et al.* (*Comp. Appls Biosci.* 8: 155-65, 1992); y Pearson *et al.* (*Methods in Molecular Biology* 24: 307-31, 1994). Altschul *et al.* (*Nature Genet.*, 6: 119-29, 1994) presentan una consideración detallada de métodos de alineamiento de secuencias y cálculos de homología.

Las herramientas de alineamiento ALIGN (Myers y Miller, *CABIOS* 4: 11-17, 1989) o LFASTA (Pearson y Lipman, 1988) pueden ser usadas para llevar a cabo comparaciones de secuencias (Internet Program© 1996, W.R. Pearson y la Universidad de Virginia, "fasta20u63", versión 2.0u63, puesto en circulación en diciembre de 1996). ALIGN compara entre sí secuencias enteras, mientras que LFASTA compara regiones de similitud local. Estas herramientas de alineamiento y sus respectivos tutoriales están disponibles en Internet en biology.ncsa.uiuc.edu.

Los ortólogos y los parálogos (más en general, homólogos) de las secuencias dadas a conocer se caracterizan normalmente por la posesión de una identidad de secuencias superior al 75% contada con respecto al alineamiento de longitud total con la secuencia con la que se comparan usando ALIGN configurado con los parámetros por defecto. Las secuencias con similitud aún mayor con las secuencias de referencia presentarán identidades porcentuales crecientes cuando sean evaluadas por este método, tales como una identidad de secuencias de al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 92%, al menos el 95%, o al menos el 98%. Además, la identidad de secuencias puede compararse con respecto a toda la longitud de uno o ambos dominios de unión de las proteínas de fusión dadas a conocer. En tal caso, las identidades porcentuales serán esencialmente similares a las divulgadas para la identidad de secuencias de longitud máxima.

Cuando, de cara a la identidad de secuencias, se compara una longitud significativamente menor que toda la secuencia, los homólogos poseerán normalmente una identidad de secuencias de al menos un 80% en ventanas pequeñas de 10-20 aminoácidos, y pueden poseer identidades de secuencias de al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99%, dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia. La identidad de secuencias en ventanas tan cortas puede ser determinada usando LFASTA; se pueden encontrar métodos en la dirección biology.ncsa.uiuc.edu de la red mundial. Un experto en la técnica apreciará que estos intervalos de identidad de secuencias son proporcionados únicamente a título orientativo; es del todo posible que pudieran obtenerse homólogos muy significativos que se encuentren fuera de los intervalos proporcionados. La presente divulgación proporciona no solo los homólogos de péptidos que han sido descritos anteriormente, sino también moléculas de ácidos nucleicos que codifican tales homólogos.

Una indicación alternativa de que dos moléculas de ácido nucleico están estrechamente relacionadas es que las dos moléculas se hibriden entre sí en condiciones estrictas. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y son diferentes bajo parámetros ambientales distintos. En general, se seleccionan condiciones estrictas que sean aproximadamente de 5°C a 20°C más bajas que el punto térmico de fusión (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (a una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente emparejada. Pueden encontrarse condiciones para la hibridación de ácidos nucleicos y el cálculo de grados de rigor en Sambrook *et al.* (en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y Tijssen (*Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Part I*, cap. 2, Elsevier, Nueva York, 1993). Las moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones estrictas con las secuencias potenciadoras dadas a conocer de SCBV normalmente se hibridarán con una sonda en función ya sea de toda la secuencia codificante de la proteína de fusión, de un dominio de unión completo o de otras porciones seleccionadas de la secuencia codificante en condiciones de lavado de $0,2\times$ SSC, 0,1% SDS a 65°C.

Las secuencias de ácidos nucleicos que no presentan un alto grado de identidad pueden, no obstante, codificar secuencias similares de aminoácidos, debido a la degeneración del código genético. Se entiende que los cambios en la secuencia de ácidos nucleicos pueden realizarse usando esta degeneración para producir múltiples secuencias de ácidos nucleicos, cada una de las cuales codifica sustancialmente la misma proteína.

ARN interferente pequeño (ARNip): ARN de aproximadamente 21-25 nucleótidos que es procesado a partir de un ARNbc por una enzima DICER (en animales) o una enzima DCL (en plantas). Los productos iniciales DICER o DCL son bicatenarios, en los cuales las dos cadenas son normalmente de 21-25 nucleótidos de longitud y contienen dos pares no emparejadas en cada extremo 3'. Las cadenas individuales dentro de la estructura del ARNip bicatenario están separadas, y normalmente uno de los ARNip está asociado entonces con un complejo de subunidades múltiples: el complejo de silenciamiento inducido por iARN (RISC). Una función típica del ARNip es guiar el RISC a la diana en función de la complementariedad de las parejas de bases.

Molécula de polinucleótido transcribible: Cualquier molécula de polinucleótido capaz de ser transcrita a una molécula de ARN. Las personas con un dominio normal de la técnica conocen métodos para introducir constructos en una célula de tal manera que la molécula de polinucleótido transcribible se transcriba formando una molécula funcional de ARNm que es traducida y, por lo tanto, expresada como un producto proteínico. Los constructos también pueden ser construidos para ser capaces de expresar moléculas de ARN antisentido, para inhibir la

traducción de una molécula específica de ARN de interés. Un experto en la técnica conoce muy bien composiciones convencionales y métodos para preparar y usar constructos y células anfitrionas (véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, tomos 1, 2 y 3. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000).

- 5 **Transcripción:** La producción de una molécula de ARN mediante ARN polimerasa como una copia complementaria de una secuencia de ADN.

Región de terminación de la transcripción: Secuencias que controlan la formación del extremo 3' de un transcrito. Las ribozimas de autoescisión y las secuencias de poliadenilación son ejemplos de secuencias de terminación de la transcripción.

- 10 **Silenciamiento transcripcional de un gen (TGS):** Un fenómeno que se desencadena por la formación de un ARNbc que es homólogo con regiones promotoras del gen y, a veces, con regiones codificantes. El TGS da como resultado la metilación del ADN y la histona y el remodelado de la cromatina, causando con ello la inhibición transcripcional en vez de la degradación del ARN. Tanto el TGS como el PTGS dependen de ARNbc, que es escindido formando ARN interferentes pequeños (de 21-25 nucleótidos) (Eckhardt, *Plant Cell*, 14:1433-1436, 2002; Aufsatz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:16499-16506, 2002).
- 15

- Transgénico:** Este término se refiere a una planta, un hongo, una célula u otra entidad u organismo que contiene material genético recombinante que no se encuentra normalmente en entidades de este tipo o especie (es decir, material genético heterólogo) y que ha sido introducido en la entidad en cuestión (o en progenitores de la entidad) mediante manipulación humana. Así, una planta que se cultiva a partir de una célula vegetal en la que ADN recombinante es introducido por transformación (una célula vegetal transformada) es una planta transgénica, como lo es toda la descendencia de esa planta que contenga el transgén introducido (con independencia de que se produzca sexual o asexualmente).
- 20

- Transformación:** Proceso mediante el cual ADN exógeno entra en una célula receptora y la cambia. Puede producirse en circunstancias normales o en condiciones artificiales usando diversos métodos muy conocidos en la técnica. La transformación puede valerse de cualquier método conocido para la inserción de secuencias foráneas de ácidos nucleicos en una célula anfitriona procarionta o eucarionta. La selección del método se ve influida por la célula anfitriona transformada y puede incluir, sin limitación, infección viral, electroporación, lipofección y bombardeo con partículas.
- 25

- Transformada:** Una célula transformada es una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico mediante técnicas de biología molecular. Las células transformadas incluyen células transformadas de forma estable en las que el ADN insertado es capaz de replicación, ya sea como un plásmido que se replica de manera autónoma o como parte del cromosoma anfitrión. También incluyen células que transitoriamente expresan el ADN o el ARN insertado durante periodos de tiempo limitados. Según se usa en la presente memoria, el término "transformación" abarca todas las técnicas por medio de las cuales una molécula de ácido nucleico podría ser introducida en tal célula, incluyendo la transfección con vectores virales, la transformación con vectores plasmídicos y la introducción de ADN desnudo mediante electroporación, lipofección y aceleración con pistola genética.
- 30
- 35

Transposón: Una secuencia de nucleótidos, tal como una secuencia de ADN o ARN que es capaz de transferir la ubicación o de moverse dentro de un gen, un cromosoma o un genoma.

- Planta transgénica:** Una planta que contiene una secuencia foránea (heteróloga) de nucleótidos insertada ya sea en su genoma nuclear o en el genoma de sus orgánulos.
- 40

Transgén: Una secuencia de ácidos nucleicos que es insertada en una célula anfitriona o en células anfitrionas mediante una técnica de transformación.

- Vector:** Una molécula de ácido nucleico introducida en una célula anfitriona, produciendo con ello una célula anfitriona transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácidos nucleicos que le permiten duplicarse en la célula anfitriona, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes terapéuticos y/o genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, haciendo con ello que la célula exprese ácidos nucleicos y/o proteínas distintas de las nativas a la célula. Opcionalmente, un vector incluye materiales para contribuir a lograr la entrada del ácido nucleico en la célula, tales como una partícula viral, un liposoma, un recubrimiento proteínico o similares.
- 45

- A no ser que se explique algo distinto, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente entendido por una persona con un dominio normal de la técnica a la que pertenece la invención. Los términos singulares "un", "una" y "el" y "la" incluyen referentes plurales, a no ser que el contexto indique claramente algo distinto. De modo similar, la palabra "o" está previsto que incluya "y", a no ser que el contexto indique claramente algo distinto. Por ende, "que comprende A o B" significa que incluye A o B, o A y B. Se entiende, además, que todos los tamaños de bases y los tamaños de aminoácidos, y todos los valores de pesos moleculares o masas moleculares dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y son proporcionados para la descripción. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los
- 50
- 55

descritos en la presente memoria en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la situación quedará zanjada por la presente memoria, que incluye explicaciones de los términos. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos son únicamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

5 *III. Visión general de varias realizaciones*

La presente divulgación describe regiones de iniciación de transcripción novedosas que comprenden un dominio potenciador y, bajo el control de potenciamiento del dominio potenciador, un dominio regulador de la transcripción. El dominio potenciador comprende varias (por ejemplo, de dos a cuatro o más) copias de un potenciador natural, pero previamente no reconocido, de SCBV dispuestas en tándem. Las regiones reguladoras de la transcripción (promotores) de la presente divulgación proporcionan una transcripción mejorada con respecto al promotor en ausencia del dominio potenciador. En una realización, se da a conocer una región quimérica reguladora de la transcripción que comprende una o más copias del elemento potenciador de SCBV mostrado de la posición (o de un homólogo del mismo); y, operativamente ligado a las mismas, un promotor que comprende un sitio de unión de la ARN polimerasa y un sitio de iniciación de ARNm, en la que, cuando se transcribe una secuencia de nucleótidos de interés bajo el control regulador de la región quimérica reguladora de la transcripción, la cantidad del producto de transcripción se potencia en comparación con la cantidad del producto de transcripción obtenida con la región quimérica reguladora de la transcripción que comprende el promotor y que no comprende la o las secuencias del potenciador de SCBV. En algunas realizaciones, la región quimérica reguladora de la transcripción comprende un promotor obtenido de la región corriente arriba de un gen de virus de una planta, de un gen bacteriano, de un gen fúngico, de un gen nuclear de una planta, de un gen extranuclear de una planta, de un gen de un invertebrado o de un gen de un vertebrado.

También se proporcionan constructos de ADN que comprenden una región reguladora descrita de la transcripción y una secuencia de ADN que ha de ser transcrita. En algunas realizaciones, se da a conocer un constructo de ADN que comprende la región de iniciación transcripcional operativamente ligada a una molécula de polinucleótido transcribible operativamente ligada a una molécula de polinucleótido de terminación de transcripción en 3'. En una realización, la molécula de polinucleótido transcribible confiere un rasgo agronómico a una planta en la que se expresa.

También se proporcionan plantas transgénicas. En una realización, una planta transgénica es transformada de manera estable con un constructo divulgado de ADN. En algunas realizaciones, la planta transgénica es una dicotiledónea. En otras realizaciones, la planta transgénica es una monocotiledónea. En una realización particular, la planta transgénica es una planta de maíz.

Se proporciona, además, una semilla de una planta transgénica dada a conocer. En una realización, la semilla comprende el constructo divulgado de ADN.

Se proporcionan también, además, una célula o un tejido vegetales transgénicos. En una realización, una célula o un tejido vegetales transgénicos comprenden una región quimérica reguladora de la transcripción que se da a conocer. En algunas realizaciones, la célula o el tejido vegetales se derivan de una dicotiledónea. En otras realizaciones, la célula o el tejido vegetales proceden de una monocotiledónea. En una realización particular, la célula o el tejido vegetales son de una planta de maíz.

También se proporcionan métodos de producción de una planta, una célula, una semilla o un tejido vegetales transgénicos. En algunas realizaciones, el método comprende la transformación de una célula o de un tejido vegetales con un constructo divulgado de ADN.

Se proporcionan, además, una célula vegetal, un fruto, una hoja, una raíz, un brote, una flor, una semilla, un esqueje u otro material reproductivo útil en la propagación sexual o asexual, plantas descendientes, incluyendo híbridos F1, plantas masculinas estériles y todas las demás plantas y los productos vegetales derivables de las plantas transgénicas divulgadas.

También se divulgan una célula, un tejido o una planta de maíz que comprenden una o más copias de un elemento potenciador de SCBV mostrado de la posición 337 a la posición 618 de la SEQ ID NO: 1 y, operativamente ligado a las mismas, un promotor heterólogo que comprende un sitio de unión de la ARN polimerasa y un sitio de iniciación de ARNm.

En una realización, una célula, un tejido o una planta de maíz comprende una o más copias de un elemento potenciador de SCBV mostrado de la posición 337 a la posición 618 de la SEQ ID NO: 1, insertándose las una o más copias del elemento potenciador de SCBV en el genoma de la célula, el tejido o la planta de maíz en una ubicación aleatoria. En algunas realizaciones, el potenciador de SCBV imparte una transcripción de una secuencia de interés de nucleótidos que está bajo el control regulador del potenciador de SCBV mejorada con respecto a la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés en ausencia del potenciador de SCBV.

IV. El potenciador de SCBV y sus usos

La presente divulgación proporciona una región potenciadora no reconocida anteriormente procedente del genoma del badnavirus baciliforme de la caña de azúcar (SCBV), potenciador que es útil para mejorar la eficacia de la transcripción, que puede resultar en una transcripción mejorada de secuencias de ADN bajo el control del potenciador. De particular interés es la transcripción mejorada de secuencias de genes que pueden ser del mismo origen genético que el anfitrión o de origen foráneo, ya se trate de las secuencias que se dan de forma natural (tanto en la orientación sentido como antisentido) o de secuencias preparadas sintéticamente. Los presentes potenciadores comprenden una pluralidad de dos o más copias de un dominio natural potenciador del SCBV no reconocido anteriormente (cuya secuencia es proporcionada en la SEQ ID NO: 1, de la posición 337 a la 618). El potenciador comprende al menos dos copias de la secuencia del dominio potenciador —en algunas realizaciones tres o cuatro o más copias— dispuestas en tándem.

También se contemplan potenciadores homólogos. Sin pretender una limitación en modo alguno, las secuencias homólogas representativas pueden incluir las procedentes de otros promotores de SCBV; por ejemplo, procedentes de diferentes aislados de SCBV, tales como los descritos en Braithwaite *et al.* (*Plant Cell Rep.* 23:319-326, 2004; incorporado a la presente memoria por referencia en su integridad) o en la patente estadounidense nº 5.994.123 (incorporada a la presente memoria por referencia en su integridad).

Un potenciador natural comprende una secuencia de ADN que, en su entorno nativo, está corriente arriba con respecto a un promotor y a menos de aproximadamente 600 pb del mismo. Tomando el nucleótido inicial del ARNm como 0, la secuencia que contiene un potenciador se encuentra de aproximadamente -50 a aproximadamente -1.000 pb, habitualmente de aproximadamente -50 a -950 pb, comprendiendo generalmente de aproximadamente -100 a -800 pb. Un dominio potenciador actúa en *cis* e, idealmente, está situado a menos de aproximadamente 10.000 pb, habitualmente aproximadamente 2.000 pb, más habitualmente adyacente a una secuencia de iniciación de la transcripción que ha de ser potenciada, o a menos de aproximadamente 1.000 pb de la misma.

El potenciador puede estar en cualquier orientación con respecto a la secuencia de iniciación de la transcripción y puede estar situado corriente arriba o corriente abajo en relación con el promotor que potencia, aunque suele estar corriente arriba. El dominio potenciador de la presente divulgación halla uso en una amplia variedad de secuencias de iniciación, incluyendo promotores que se encuentran de forma natural bajo el control del potenciador —por ejemplo, en una posición *cis* (adyacente y homóloga)—, así como las normalmente no asociadas con el potenciador particular (por ejemplo, heterólogas). El dominio potenciador y el dominio de iniciación de la transcripción pueden ser de reinos, familias o especies iguales o diferentes. Las especies de interés incluyen los procariotas y los eucariotas, tales como bacterias, plantas, insectos, mamíferos, etc. Las combinaciones incluyen el o los dominios potenciadores (virales) descritos de SCBV con una región de iniciación de transcripción de un gen estructural de: un anfitrión para el SCBV (procedente, por ejemplo, de la caña de azúcar), otra especie vegetal (por ejemplo, de una familia igual o diferente), un insecto, un animal vertebrado, una bacteria, un hongo, etcétera.

La divulgación también contempla constructos de ADN que comprenden una región de iniciación de transcripción sujeto y, bajo el control de la región de iniciación de transcripción, una secuencia de ADN que ha de ser transcrita. La secuencia de ADN puede comprender un marco abierto natural de lectura que incluye secuencias flanqueantes 5' y 3' transcritas. Alternativamente, puede comprender una secuencia antisentido, porque codifique el complemento de una molécula de ARN o una porción del mismo. Cuando el constructo incluye un marco abierto de lectura (ORF) que codifica una proteína, se obtiene una tasa mejorada de iniciación de la transcripción, habitualmente proporcionando una mayor cantidad del producto de expresión de polipéptido del gen. Cuando el constructo comprende una secuencia antisentido, la transcripción mejorada de ARN complementario a la forma natural suprime la expresión del ARNm de la forma natural, disminuyendo con ello la cantidad del producto de expresión de polipéptido; se contempla que el ARNm de la forma natural en cuestión pueda corresponder a un ARNm nativo de la célula anfitriona o al ARNm de un patógeno, tal como un virus o un hongo.

En diversas realizaciones, la secuencia de ADN que ha de ser transcrita incluye: una o varias secuencias codificantes de proteínas de un gen (procedentes, por ejemplo, de una planta, un animal, una bacteria, un virus o un hongo), que pueden incluir: uno o varios marcos abiertos de lectura naturales que codifican un producto proteínico; secuencias de ADN complementario (ADNc) derivadas del ARNm codificado por un gen; ADN sintético que dé la o las secuencias codificantes deseadas; una o varias secuencias codificantes de proteínas derivadas de exones de un gen natural, tales como uno o más marcos abiertos de lectura producidos por ligadura de exones; y/o combinaciones de dos o más cualesquiera de los mismos. Unidas a estas secuencias apropiadas hay secuencias apropiadas de terminación/poliadenilación de transcripción; secuencias procedentes de un gen natural (por ejemplo, procedente de una planta, un animal, una bacteria, un virus o un hongo) que codifique un producto de ARN primario que consista en exones e intrones (por ejemplo, genes de eucariotas transcritos por polimerasa II y polimerasa III naturales); secuencias de ADN sintético que codifiquen un ARN o un producto proteínico específicos; secuencias de ADN modificadas a partir de una secuencia codificante conocida (por ejemplo, una secuencia de genes naturales) por mutagénesis (tal como la mutagénesis específica al sitio) y/u otra tecnología de ingeniería genética; quimeras de cualesquiera de los anteriores logradas por ligadura de fragmentos de ADN, incluyendo quimeras que codifican proteínas de fusión; y/o secuencias de ADN que codifiquen el complemento de moléculas de ARN o porciones del mismo.

La transcripción mejorada en plantas puede encontrar uso en la mejora de la producción de proteínas características de la planta (endógenas; es decir, normalmente encontradas en el anfitrión de la forma natural) o de aquellas proteínas de otras fuentes genéticas (exógenas; es decir, normalmente no encontradas en el anfitrión de la forma natural). Ejemplos de tipos de secuencias para ser expresadas a partir de potenciadores y regiones quiméricas reguladoras de la transcripción descritos en la presente memoria incluyen: ARN antisentido o inhibidores pequeños (para la supresión de genes); proteínas nutricionalmente importantes; factores promotores del crecimiento; proteínas que dan protección a la planta en ciertas condiciones ambientales —por ejemplo, proteínas que confieren resistencia a metales, a la sal o a otra toxicidad; proteínas relacionadas con el estrés, que dan tolerancia a extremos de temperatura, congelación, etc.—; proteínas que confieren a la planta protección relacionada con plagas o infecciones —por ejemplo, proteínas que dan resistencia a una infección bacteriana, fúngica o microbiana de otro tipo—; o resistencia a la depredación por insectos (por ejemplo, la toxina *B. thuringiensis*) o a otros animales invertebrados o vertebrados; compuestos de importancia médica fuera de la planta —por ejemplo, antimicrobianos, antitumorales, etc.—; proteínas u otros compuestos de valor comercial específico; mayor nivel de proteínas —por ejemplo, enzimas de sistemas metabólicos (por ejemplo, sistemas para la producción de compuestos polifenólicos u otros metabolitos secundarios)—; mayores niveles de productos de valor estructural para una planta anfitriona; etcétera. Las secuencias de interés que se transcriben serán al menos de aproximadamente 8 pb, al menos de aproximadamente 12 pb, al menos de aproximadamente 20 pb, y pueden tener una longitud de uno o más kilopares base (kpb).

V. Constructos

Los constructos de la presente divulgación contienen normalmente una región quimérica reguladora de la transcripción que comprenden una o más copias del elemento potenciador de SCBV proporcionado operativamente ligadas a un promotor (que habitualmente contiene, al menos, un sitio de unión de la ARN polimerasa y un sitio de iniciación de ARNm), región que está operativamente ligada a una molécula de polinucleótido transcribible operativamente ligada a una molécula de polinucleótido de terminación de transcripción en 3'. Además, los constructos pueden incluir, sin limitación, moléculas de polinucleótidos reguladoras adicionales procedentes de la región no traducida 3' (3' UTR) de genes vegetales (por ejemplo, una 3' UTR para aumentar la estabilidad del ARNm, tal como la región de terminación PI-II de la patata o las regiones de terminación 3' de octopina o nopalina sintasa). Los constructos pueden incluir, sin limitación, las regiones no traducidas 5' (5' UTR) de una molécula de polinucleótidos de ARNm que pueden desempeñar un papel importante en la iniciación de la traducción y también puede ser un componente genético en un constructo de expresión vegetal. Por ejemplo, se ha demostrado que las moléculas de polinucleótidos de líderes 5' no traducidos derivados de genes de proteínas de choque térmico mejoran la expresión génica en plantas (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 5.659.122 y 5.362.865, cada una de las cuales está incorporada por referencia en su integridad). Tales moléculas adicionales de polinucleótidos reguladoras corriente arriba y corriente abajo en el constructo pueden estar derivadas de una fuente que sea nativa o heteróloga con respecto a los otros elementos presentes en el constructo.

Así, una realización es un constructo que comprende una región quimérica reguladora de la transcripción que comprende ella misma una o más copias (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más copias) del elemento potenciador de SCBV mostrado de la posición 337 a la posición 618 de la SEQ ID NO: 1 (o de un homólogo del mismo) operativamente ligado a un promotor, operativamente ligado a una molécula de polinucleótido transcribible para dirigir la transcripción de dicha molécula de polinucleótido transcribible a un nivel deseado y/o en un tejido deseado o un patrón de desarrollo tras la introducción del constructo en una célula vegetal. En algunos ejemplos, la molécula de polinucleótido transcribible comprende una región codificante de proteínas de un gen, y la región quimérica reguladora de la transcripción proporciona la transcripción de una molécula funcional de ARNm que es traducida y expresada como un producto proteínico a partir del constructo. En otra realización, la molécula de polinucleótido transcribible comprende una región antisentido de un gen, y la región quimérica reguladora de la transcripción afecta a la transcripción de una molécula de una molécula de ARN antisentido o de otro ARN inhibidor similar para inhibir la expresión de una molécula de interés específica de ARN en una célula anfitriona diana.

Más constructos ejemplares adicionales de la presente divulgación incluyen constructos de ADN de borde del plásmido It doble que tienen las regiones del borde derecho (RB o AGRtu.RB) y del borde izquierdo (LB o AGRtu.LB) del plásmido It aisladas del *Agrobacterium tumefaciens*, que comprenden un ADN-T, que, junto con las moléculas de transferencia proporcionadas por las células *Agrobacterium*, permiten la integración del ADN-T en el genoma de una célula vegetal. Los constructos también pueden contener segmentos de ADN de la cadena principal 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 una amplia gama de anfitriones tal como oriV u oriRi, y una región codificante para un marcador seleccionable tal como Spec/Strp, que codifica la Tn7 aminoglucósido adeniltransferasa (aadA), que confiere resistencia a la espectinomicina o a la estreptomycinina, o un gen marcador seleccionable de gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación de plantas, cepas bacterianas anfitrionas representativas incluyen *Agrobacterium tumefaciens* ABI, C58 o LBA4404; sin embargo, pueden usarse otras cepas conocidas por los expertos en la técnica de transformación de plantas.

También se contemplan constructos que comprenden al menos un elemento potenciador de SCBV (opcionalmente, en el contexto de una región quimérica reguladora de la transcripción), constructo que es un constructo de etiquetado de activación. El etiquetado de activación es un método por medio del cual los genes son regulados

aleatoria e intensamente al alza a escala genómica, después de lo cual se pueden evaluar y seleccionar fenotipos específicos. Se conocen componentes útiles en diversos tipos de constructos de etiquetado de activación; véanse, por ejemplo: Walden *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 26: 1521-8, 1994 (que describen un constructo de etiquetado de ADN-T de activación que se usó para activar genes en un cultivo de células de tabaco que permitía que las células crecieran en ausencia de hormonas de crecimiento vegetal); Miklashevichs *et al.*, *Plant J.* 12: 489-98, 1997; Harling *et al.*, *EMBO J.* 16: 5855-66, 1997; Walden *et al.*, *EMBO J.* 13: 4729-36, 1994 (informes de genes aislados de secuencias genómicas vegetales que flanquean la etiqueta de ADN-T e implicados putativamente en las respuestas hormonales de crecimiento vegetal); Schell *et al.*, *Trends Plant Sci.* 3: 130, 1998 (que presentan la investigación de un grupo de estudios relacionados); Kardailsky *et al.*, *Science* 286: 1962-1965, 1999 (que describen el etiquetado de ADN-T de activación y la evaluación de plantas para un fenotipo de floración temprana); Koncz *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86(21):8467-71, 1989 (que describen el etiquetado de activación usando el promotor del gen 5 (pg5) del *Agrobacterium*, que es activo únicamente en células proliferativas y debe insertarse directamente adyacente a un gen vegetal para influir en su expresión); Wilson *et al.*, *Plant Cell* 8: 659-671, 1996 (etiquetado de activación que utiliza un transposón Ds modificado que contiene el promotor CaMV 35S y un casete de selección nos::hpt) y Schaffer *et al.*, *Cell* 93: 1219-1229, 1998 (que ilustran el mismo sistema usado para regular al alza genes vegetales adyacentes que da como resultado mutaciones dominantes con ganancia de funciones); y Weigel *et al.*, *Plant Physiology*, 122: 1003-1013, 2000 (que ilustran vectores de etiquetado de activación que son útiles para evaluar decenas de miles de plantas transformadas en cuanto a sus fenotipos morfológicos).

VI. Secuencias de nucleótidos para la mejora de la transcripción

Las moléculas ejemplares de polinucleótidos transcribibles para la mejora de la transcripción por incorporación en constructos proporcionadas en la presente memoria incluyen, por ejemplo, moléculas de polinucleótidos o genes de una especie distinta de la especie diana o genes que se originan con la misma especie o están presentes en la misma, pero que son incorporados en células receptoras a través de métodos de ingeniería genética en vez de mediante técnicas clásicas de reproducción o cultivo. El tipo de molécula de polinucleótido puede incluir, sin limitación, una molécula de polinucleótido que ya esté presente en la célula vegetal diana, 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, sintética o modificada de otro modo de un transgén.

En una realización, una molécula de polinucleótido, según se muestra de la posición 337 a la 618 de la SEQ ID NO: 1 (o dos o más copias de la misma) (por ejemplo, en el contexto de una región quimérica de iniciación de la transcripción) es incorporada en un constructo de modo que la secuencia potenciadora de SCBV descrita (o una serie de dos o más secuencias de ese tipo) esté operativamente ligada a una molécula de polinucleótido transcribible que es un gen de interés agronómico u otra secuencia de expresión (más en general, una secuencia de nucleótidos de interés). Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "gen de interés agronómico" se refiere a una molécula de polinucleótido transcribible que incluye, sin limitación, un gen que proporciona una característica deseable asociada con la morfología, la fisiología, el crecimiento y el desarrollo, la producción, la potenciación nutricional, la resistencia a las enfermedades o a las plagas, o la tolerancia medioambiental o química de la planta. La expresión de un gen de interés agronómico es deseable para conferir, por ejemplo, un rasgo agronómicamente importante. Un gen de interés agronómico que proporcione un rasgo agronómico beneficioso a plantas cultivadas puede ser, por ejemplo, una o más secuencias que confieran a una planta que exprese el gen: resistencia a herbicidas (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 6.803.501, 6.448.476, 6.248.876, 6.225.114, 6.107.549, 5.866.775, 5.804.425, 5.633.435, 5.463.175, y las publicaciones estadounidenses US20030135879 y US20030115626), mayor producción (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense USRE38.446, las patentes estadounidenses n^{os} 6.716.474, 6.663.906, 6.476.295, 6.441.277, 6.423.828, 6.399.330, 6.372.211, 6.235.971, 6.222.098, 5.716.837), control de insectos (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 6.809.078, 6.713.063, 6.686.452, 6.657.046, 6.645.497, 6.642.030, 6.639.054, 6.620.988, 6.593.293, 6.555.655, 6.538.109, 6.537.756, 6.521.442, 6.501.009, 6.468.523, 6.326.351, 6.313.378, 6.284.949, 6.281.016, 6.248.536, 6.242.241, 6.221.649, 6.177.615, 6.156.573, 6.153.814, 6.110.464, 6.093.695, 6.063.756, 6.063.597, 6.023.013, 5.959.091, 5.942.664, 5.942.658, 5.880.275, 5.763.245, 5.763.241), resistencia a las enfermedades fúngicas (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 6.653.280, 6.573.361, 6.506.962, 6.316.407, 6.215.048, 5.516.671, 5.773.696, 6.121.436, 6.316.407, 6.506.962), resistencia a los virus (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 6.617.496, 6.608.241, 6.015.940, 6.013.864, 5.850.023, 5.304.730), resistencia a los nematodos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n^o 6.228.992), resistencia a enfermedades bacterianas (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n^o 5.516.671), crecimiento y desarrollo vegetales (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 6.723.897, 6.518.488), producción de fécula (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 6.538.181, 6.538.179, 6.538.178, 5.750.876, 6.476.295), producción de aceites modificados (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 6.444.876, 6.426.447, 6.380.462), producción elevada de aceite (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 6.495.739, 5.608.149, 6.483.008, 6.476.295), contenido en ácidos grasos modificados (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 6.828.475, 6.822.141, 6.770.465, 6.706.950, 6.660.849, 6.596.538, 6.589.767, 6.537.750, 6.489.461, 6.459.018), producción de fibra (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 6.576.818, 6.271.443, 5.981.834, 5.869.720), producción elevada de proteína (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n^o 6.380.466),

5 maduración de los frutos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 5.512.466), mejor digestibilidad (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 6.531.648), mejor sabor (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 6.011.199), baja rafinosa (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 6.166.292), mejor nutrición animal y/o humana (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses nºs 6.723.837, 6.653.530, 6.541.259, 5.985.605, 6.171.640), resistencia al estrés medioambiental (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 6.072.103), péptidos deseables (por ejemplo, péptidos farmacéuticos o secretables) (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses nºs 6.812.379, 6.774.283, 6.140.075, 6.080.560), rasgos mejorados de procesamiento (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 6.476.295), producción industrial de enzimas (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 5.543.576), fijación de nitrógeno (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 5.229.114), producción de semillas híbridas (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 5.689.041), biopolímeros (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense nº USRE37.543, las patentes estadounidenses nºs 6.228.623, 5.958.745 y la publicación estadounidense nº US20030028917) y la producción de biocombustibles (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 5.998.700).

15 Alternativamente, una molécula de polinucleótido transcribible puede influir en una característica vegetal mencionada anteriormente (o en otra) o en fenotipos codificando una molécula antisentido o de ARN que cause la inhibición seleccionada de la expresión de un gen endógeno; por ejemplo, mediante ARN inhibidor (ARNi) antisentido, o mecanismos arbitrados por la cosupresión. El ARN también podría ser una molécula catalítica de ARN (una ribozima) diseñada para escindir un producto deseado de ARNm endógeno. Así, cualquier molécula de polinucleótido transcribible que codifique una molécula de ARN transcrito que afecte a un cambio de interés en el fenotipo, bioquímico o morfológico puede beneficiarse de la mejora transcripcional permitida por las secuencias y los constructos proporcionados en la presente memoria.

25 El potenciador descrito de SCBV o la región quimérica reguladora de la transcripción que comprende una o más copias del mismo pueden ser incorporados en un constructo con uno o más genes marcadores (cualquier molécula de polinucleótido transcribible cuya expresión pueda ser evaluada o calificada de alguna manera) y sometidos a ensayo en análisis en plantas transitorias o estables para proporcionar una indicación del patrón de la expresión génica del elemento regulador en plantas transgénicas estables. Los genes marcadores para ser usados en la puesta en práctica de tales realizaciones incluyen, sin limitación, moléculas de polinucleótidos transcribibles que codifican β -glucuronidasa (GUS, descrita en la patente estadounidense nº 5.599.670) y la proteína fluorescente verde (GFP, descrita en las patentes estadounidenses nºs 5.491.084 y 6.146.826), 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 los que codifican proteínas que confieren resistencia a la kanamicina (nptII), a la higromicina B (aph IV), a la estreptomina o a la espectinomicina (aad, spec/strep) y a la gentamicina (aac3 y aacC4). Los herbicidas a los cuales se ha demostrado tolerancia y a los que se puede aplicar el método de la presente invención, incluyen, sin limitación: herbicidas de glifosato, glufosinato, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinil, dalapón, ciclohexanodiona, inhibidores de la topoporfirinógeno oxidasa, e isoxaflutol. En la técnica se conocen moléculas de polinucleótidos que codifican proteínas implicadas en la tolerancia a herbicidas, e incluyen, sin limitación, una molécula de polinucleótido que codifica la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS, descrito en las patentes estadounidenses nºs 5.627.061, 5.633.435, 6.040.497 y en la patente estadounidense nº 5.094.945 para la tolerancia al glifosato); polinucleótidos que codifican una glifosato oxidoreductasa y una glifosato-N-acetil transferasa (GOX, descrito en la patente estadounidense nº 5.463.175, y GAT, descrito en la publicación estadounidense nº 20030083480); una molécula de polinucleótido que codifica la bromoxinil nitrilasa (Bxn, descrita en la patente estadounidense nº 4.810.648 para la tolerancia al bromoxinil); una molécula de polinucleótido que codifica la fitoeno desaturasa (crtl), descrita en Misawa *et al.* (*Plant J.* 4:833-840, 1993) y Misawa *et al.* (*Plant J.* 6:481-489, 1994) para la tolerancia a la norflurazona; una molécula de polinucleótido que codifica la acetohidroxiácido sintasa (AHAS, también denominada ALS), descrita en Sathasiivan *et al.* (*Nucl. Acids Res.* 18:2188-2193, 1990) para la tolerancia a los herbicidas de sulfonilurea; una molécula de polinucleótido que codifica una enzima oxigenasa degradadora de la dicamba (descrita en las publicaciones de patente estadounidense US20030135879 y US20030115626, para la tolerancia a la dicamba); y el gen *bar*, descrito en DeBlock *et al.* (*EMBO J.* 6:2513- 2519, 1987) para la tolerancia al glufosinato y al bialafós. Los elementos reguladores de la presente divulgación pueden expresar moléculas de polinucleótidos transcribibles que codifican fosfinotricina acetiltransferasa, EPSPS resistente a glifosato, aminoglucósido fosfotransferasa, hidroxifenil piruvato deshidrogenasa, higromicina fosfotransferasa, neomicina fosfotransferasa, dalapón deshalogenasa, nitrilasa resistente a bromoxinil, antranilato sintasa, glifosato oxidoreductasa y glifosato-N-acetil transferasa.

55 Los constructos que contienen al menos un potenciador de SCBV (por ejemplo, en el contexto de una región quimérica reguladora de la transcripción) operativamente ligado a un gen marcador o a otra secuencia de nucleótidos de interés pueden ser distribuidos a tejidos (por ejemplo, transformados) y los tejidos analizados por el mecanismo apropiado, dependiendo del marcador o la secuencia que se esté transcribiendo. Tales análisis cuantitativos o cualitativos pueden ser usados como herramientas para evaluar el perfil de expresión potencial de un elemento regulador cuando está operativamente ligado a un gen de interés agronómico en plantas estables. El gen marcador puede ser usado en un ensayo transitorio; las personas con un dominio normal de la técnica conocen métodos de ensayo para la identificación de la expresión del gen marcador en ensayos transitorios. La expresión transitoria de genes marcadores ha sido documentada usando diversas plantas, tejidos y sistemas de distribución de ADN. Por ejemplo, los sistemas de análisis transitorios incluyen, sin limitación, distribución directa de genes

mediante electroporación o bombardeo de tejidos con partículas en cualquier ensayo transitorio en plantas usando cualquier especie vegetal de interés. Tales sistemas transitorios incluirían, sin limitación, la electroporación de protoplastos de diversos orígenes tisulares o el bombardeo de tejidos específicos de interés con partículas. La presente divulgación abarca el uso de cualquier sistema de expresión transitoria para evaluar elementos reguladores operativamente ligados a cualquier molécula de polinucleótido transcribible, incluyendo, sin limitación, genes marcadores o genes de interés agronómico. Ejemplos de tejidos vegetales que se contempla someter a ensayo en formas transitorias mediante un sistema de distribución apropiado incluirían, sin limitación, tejidos base de la hoja, callos, cotiledones, raíces, endospermo, embriones, tejido floral, polen y tejido epidérmico.

VII. Transformación de plantas

Un constructo de transformación de plantas que contiene un elemento potenciador (o múltiples copias del mismo) o una región quimérica reguladora de la transcripción según se describe en la presente memoria puede ser introducido en plantas usando cualquier método de transformación vegetal. Los métodos y los materiales para transformar plantas introduciendo un constructo de expresión vegetal en un genoma de planta en la práctica de esta invención pueden incluir cualquiera de los métodos bien conocidos y demostrados, incluyendo la electroporación (por ejemplo, la patente estadounidense n° 5,384,253), el bombardeo con microproyectiles (por ejemplo, las patentes estadounidenses n°s 5.015.580, 5.550.318, 5.538.880, 6.160.208, 6.399.861 y 6.403.865), la transformación arbitrada por *Agrobacterium* (por ejemplo, las patentes estadounidenses n°s 5.824.877, 5.591.616, 5.981.840 y 6.384.301), y la transformación de protoplastos (por ejemplo, la patente estadounidense n° 5.508.184). Resultará evidente para los expertos en la técnica que varias metodologías de transformación pueden ser usadas y modificadas para la producción de plantas transgénicas estables a partir de un número cualquiera de cultivos diana de interés.

Los expertos en la técnica conocen métodos específicos de transformación de dicotiledóneas. A título de ejemplo, se han descrito métodos de transformación y regeneración de plantas para varios cultivos, incluyendo, sin limitación, algodón (*Gossypium hirsutum*), soja (*Glycine max*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), y miembros del género Brassica.

Asimismo, los expertos en la técnica también conocen métodos específicos para transformar monocotiledóneas. A título de ejemplo, se han descrito métodos de transformación y regeneración de plantas para varios cultivos, incluyendo, sin limitación, cebada (*Hordeum vulgare*), maíz (*Zea mays*), avena (*Avena sativa*), pasto ovillo (*Dactylis glomerata*), arroz (*Oryza sativa*, incluyendo las variedades índica y japónica), sorgo (*Sorghum bicolor*), caña de azúcar (*Saccharum* sp), festuca alta (*Festuca arundinacea*), especies de césped (por ejemplo, *Agrostis stolonifera*, *Poa pratensis*, *Stenotaphrum secundatum*), trigo (*Triticum aestivum*) y alfalfa (*Medicago sativa*).

Las plantas transformadas pueden ser analizadas para detectar la presencia del o de los genes de interés y el nivel y/o el perfil de expresión conferidos por las regiones quiméricas reguladoras de la transcripción descritas en la presente memoria. Hay disponibles numerosos métodos para las personas con un dominio normal de la técnica para el análisis de plantas transformadas. Por ejemplo, los métodos para el análisis de plantas incluyen los análisis de transferencia de tipos Southern y Northern, los planteamientos basados en PCR (o basados en la amplificación de otro ácido nucleico), análisis bioquímicos, métodos de evaluación fenotípica, evaluaciones de campo y ensayos inmunodiagnósticos (por ejemplo, para la detección, la localización y/o la cuantificación de proteínas).

La expresión mejorada de genes usando el potenciador descrito de SCBV ha sido demostrada en el maíz, pero se prevé que el potenciador funcione en otras especies vegetales, incluyendo posiblemente las dicotiledóneas, así como las monocotiledóneas. El elemento potenciador con cuatro copias de la región corriente arriba de SCBV proporcionó el mayor nivel de expresión de las combinaciones estudiadas en la presente memoria. Menos o más copias de la región corriente arriba, así como combinaciones con elementos potenciadores de otros orígenes también podrían proporcionar ventajas para modular la expresión génica. Los mismos activadores, constructos y planteamientos pueden ser útiles para otras especies cultivadas para las que puedan identificarse genes porque la secuencia genómica esté disponible o en vías de obtención (incluyendo sorgo (*Sorghum bicolor*), trigo (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum vulgare*), mijo (*Setaria italica*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), *Miscanthus giganteus*) o para las que puedan identificarse "genes activados" mediante esfuerzos futuros de secuenciación genómica o, quizás, de sintenia cromosómica (incluyendo avena (*Avena sativa*), centeno (*Secale cereale*), mijo perla (*Pennisetum glaucum*), mijo de dedo (*Eluesine coracana*), mijo común (*Panicum miliaceum*), tef (*Eragrostis tef*)), o para especies modélicas de yerba para las cuales la secuencia genómica esté disponible o en vías de obtención (incluyendo la falsa espiguilla morada (*Brachypodium distachyon*) y el almorejo (*Setaria viridis*)).

Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar ciertas características y/o realizaciones particulares. No debiera interpretarse que estos ejemplos limiten la invención a las características o realizaciones particulares descritas.

55

Ejemplo 1**Identificación de secuencias que comprenden un elemento potenciador promotor del virus baciliforme de la caña de azúcar (SCBV)**

5 Este ejemplo demuestra la identificación de secuencias que incluyendo el elemento potenciador del promotor de SCBV.

Un fragmento promotor derivado del genoma de un SCBV (n° de acceso AJ277091 de GenBank, y descrito por Geijskes *et al.*, *Arch. Viral.*, 147: 2393- 2404, 2002) fue examinado, en primer lugar, mediante ensayos de expresión transitoria para determinar qué regiones de la secuencia del promotor contienen secuencias del elemento potenciador. En el estudio del análisis del promotor, fragmentos derivados del promotor de SCBV (SEQ ID NO: 1) que contenían secuencias del pb -839 al +106 (plásmido pSCBV839), del pb -576 al +106 (plásmido pSCBV576), y del pb -333 al +106 (plásmido pSCBV333) desde el sitio del inicio de la transcripción (definido como la posición +1) fueron clonados corriente arriba de una región codificante de la proteína indicadora de la luciferasa (LUC) de la luciérnaga. La transcripción se terminó mediante una copia de la región 3' UTR de nopalina sintasa (Nos) (según se da a conocer en las bases 1847 a 2103 del n° de acceso V00087.1 de GenBank, que es incorporado por referencia por la presente en su integridad, y en la FIG. 1). Las actividades transcripcionales transitorias de estos constructos fueron sometidas a ensayo transformándolos mediante bombardeo de partículas en células Hi-II de maíz en suspensión (descritas con detalle posteriormente en el Ejemplo 2) y monitorizando la actividad del gen indicador LUC. La actividad de la luciferasa fue normalizada en cada experimento mediante cotransformación con una cantidad equimolar del ADN plasmídico que contiene un constructo SCBV:LUC y del ADN de un plásmido de referencia que alberga un constructo constituido por un promotor del gen ubiquitina 1 (ubi1) del maíz (según se divulga en la patente estadounidense n° 5.510.474 que es incorporada por la presente por referencia en su integridad; esencialmente las bases 7 a 1990 del n° de acceso S94464.1 de GenBank, que es incorporado por la presente por referencia en su integridad) que activa la expresión de una región codificante GUS (beta-glucuronidasa), y terminado por un terminador 3' UTR Per5 del maíz (según se da a conocer en la patente estadounidense n° 6.699.984, que es incorporada por la presente por referencia en su integridad; por ejemplo, el constructo ubi1:GUS). Dos días después del bombardeo, la proteína total fue aislada de las células transformadas y se midieron la actividad enzimática de LUC (expresada en unidades de luciferasa (LU)/mg de proteína) y la actividad enzimática de GUS (expresada en unidades de actividad de GUS (GU)/µg de proteína) mediante métodos encontrados, por ejemplo, en Maliga *et al.*, *Methods in Plant Molecular Biology. A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Las actividades relativas de los promotores de ensayo en los tres constructos SCBV:LUC fueron comparadas normalizando los niveles de LUC con respecto a los niveles de GUS como la proporción de LU/mg de proteína:GU/µg de proteína. Los resultados del ensayo transitorio mostraron que la actividad de LUC aumentaba linealmente con concentraciones crecientes del ADN plasmídico bombardeado, indicando que la actividad de LUC está correlacionada con los niveles del transcrito. Además, el fragmento promotor de SCBV que contenía secuencias del pb -576 pb corriente arriba al +106 corriente abajo del sitio del inicio de la transcripción tenía un 66% ± 2% de la actividad del fragmento promotor de longitud máxima (aquí definido como que contiene las secuencias del pb -839 corriente arriba al +106 corriente abajo del sitio de inicio). En cambio, el fragmento promotor que contenía secuencias del pb -333 corriente arriba al + 106 corriente abajo del sitio del inicio de la transcripción solo tenía una 17% ± 1% de la actividad del promotor de longitud máxima. Así, las secuencias para la mayoría de la actividad del promotor de SCBV residen corriente arriba del pb -333 desde el sitio del inicio de la transcripción.

Se examinó la porción de la secuencia promotora de SCBV capaz de mejorar la transcripción activada por una secuencia del promotor mínimo heterólogo. Según definen estos experimentos, un elemento potenciador es identificado operativamente como una secuencia corta (de 200 a 300 pb) de ADN que actúa en *cis*, que carece de caja TATA, que, cuando es situada 5' proximal a una secuencia del promotor mínimo heterólogo, aumenta la actividad de expresión del promotor mínimo heterólogo de manera reproducible y medible cuando es sometido a ensayo en un sistema de transformación ya sea transitoria o estable. Además, las duplicaciones en tándem del elemento potenciador proporcionan niveles de la actividad de expresión del promotor mínimo heterólogo aún más altos que las copias aisladas del elemento potenciador. El elemento promotor mínimo heterólogo utilizado en este Ejemplo comprende bases de -100 a +106 de un promotor (correspondiente a las bases 997 a 1202 del n° de acceso X04049 de GenBank, que es incorporado por referencia por la presente en su integridad tal como estaba disponible públicamente el 30 de agosto de 2010) del gen alcohol deshidrogenasa 1 (Adh1) del maíz.

Dos fragmentos derivados del promotor de SCBV, que comprendían las secuencias del pb -503 al -222 y del pb -758 al -222 con respecto al sitio del inicio de la transcripción, fueron clonados 5' con secuencias que comprendían un promotor Adh1 mínimo del maíz fusionado a una región codificante que codifica una proteína luciferasa (LUC) de la luciérnaga. La transcripción de los genes quiméricos fue terminada por la 3' UTR Nos, según se ha descrito anteriormente. Células de cultivo Hi-II de maíz en suspensión fueron transformadas por bombardeo con partículas con ADN de plásmidos que albergaban constructos LUC y GUS, y las actividades enzimáticas fueron medidas y comparadas como anteriormente. Los plásmidos que contenían los constructos LUC que tenían las secuencias de -503 a -222 o las secuencias de -758 a -222 situados 5' con respecto al promotor Adh1 mínimo presentaron una actividad LUC 6 veces y 4 veces mayor, respectivamente, que la del promotor Adh1 mínimo sin las secuencias

añadidas de SCBV. Así, las secuencias dentro de estos fragmentos del promotor de SCBV mejoran la actividad de transcripción arbitrada por un promotor heterólogo del maíz.

La capacidad de múltiples copias de la región potenciadora de SCBV del pb -503 al -222 para mejorar la expresión arbitrada por el promotor Adh1 mínimo fue sometida a ensayo clonando una, dos o cuatro copias de las secuencias del pb -502 al -222 5' con respecto al promotor Adh1 mínimo del maíz fusionado a la región codificante de LUC (FIG. 3A). Se bombardearon ADN plasmídicos que albergaban los constructos (así como ADN plasmídico que tenía un constructo ubi1:GUS de referencia) en células de cultivo Hi-II de maíz en suspensión, y las actividades de LUC y GUS fueron medidas y comparadas como anteriormente. Las células bombardeadas con constructos que contenían 1 copia, 2 copias o 4 copias de la región de secuencias potenciadoras de SCBV tenían más de 5 veces, 6 veces y 10 veces, respectivamente, la actividad de LUC que las células bombardeadas con un constructo análogo promotor Adh1 mínimo que carecía de las secuencias potenciadoras de SCBV (FIG. 3B).

Las bases de ácido nucleico que comprenden del pb -502 al -222 del promotor de SCBV, proporcionadas en la SEQ ID NO: 1, codifican la actividad de activación transcripcional que puede conferir características superiores de expresión a un promotor vegetal. Además, la actividad de activación transcripcional aumenta por el apilamiento de múltiples copias en tándem de las bases que comprenden del pb -502 al -222 del promotor de SCBV, proporcionadas en la SEQ ID NO: 1. Adicionalmente también, los métodos y los reactivos proporcionados en la presente memoria pueden ser examinados adicionalmente y utilizados para proporcionar secuencias aún más cortas que retengan la actividad de activación transcripcional, o pueden combinarse con otros elementos activadores transcripcionales y promotores vegetales en nuevas combinaciones.

Ejemplo 2

Sometimiento a ensayo de la expresión transitoria de los constructos SCBV:LUC y ubi1:GUS en células de cultivo Hi-II de maíz en suspensión

Este ejemplo describe el sometimiento a ensayo de la expresión transitoria de los constructos SCBV:LUC y ubi1:GUS en células de cultivo Hi-II de maíz en suspensión.

Células de cultivo Hi-II de maíz en suspensión (Armstrong *et al.*, *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 65:92-93, 1991) fueron transformados por bombardeo de partículas con ADN de plásmidos que albergaban constructos LUC y GUS construidos según se ha descrito anteriormente, y las actividades enzimáticas fueron medidas y comparadas. Se crearon preparaciones volumétricas de ADN plasmídicos usando QiAfilter™ Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Germantown, Maryland) y se analizaron la cantidad y la calidad usando métodos moleculares estándar.

Preparación de células de cultivo Hi-II de maíz en suspensión para su bombardeo. Las células se mantuvieron en un agitador a 125 rpm en un caldo de cultivo H9CP+ a 28° en la oscuridad (el caldo de cultivo H9CP consiste en: sales MS 4,3 g/L, sacarosa 3%, casaminoácidos 200 mg/L, mioinositol 100 mg/L, 2,4-D 2 mg/L, NAA 2 mg/L, vitaminas MS 1000X 1 mL/L, L-prolina 700 mg/L y agua de coco (Sigma Aldrich, San Luis, Misuri) 62,5 mL/L, pH 6,0). Antes del bombardeo, los cultivos de Hi-II de 2 días fueron transferidos a un caldo de cultivo G-N6 (caldo de cultivo CHU N6 3,98 g/L, vitaminas CHU N6 1 mL/L (ambos componentes CHU provenientes de los *PhytoTechnology Laboratories*®, Lenexa, Kansas), mioinositol 100 mg/L, 2,4-D 2 mg/L y sacarosa 3%, pH 6,0) y se permitió que se desarrollaran durante 24 horas. En el día del bombardeo, las células desarrolladas en G-N6 (2,5 g de células) fueron transferidas a discos estériles Whatman nº 1 de filtrado (55 mm) puestas en un caldo de cultivo G-N6 que contenía 0,5 M D-sorbitol y 0,5 M D-manitol e incubadas durante 4 horas. Las células osmóticamente ajustadas son usadas para el bombardeo.

Preparación de partículas de oro con ADN plasmídicos y ensayo de bombardeo. Se lavaron partículas de oro (1 µm de diámetro, BioRad, Hercules, California) con etanol al 70% durante 10 minutos, luego tres veces con agua estéril. Las partículas fueron distribuidas en glicerol al 50% a una concentración de 120 mg/mL. Para un experimento típico, se combinaron 150 µL (18 mg) de partículas de oro, aproximadamente 5 µg de ADN plasmídico, 150 µL de 2,5 M CaCl₂ y 30 µL de 0,2 M espermidina. La reacción (volumen total 375 µL) fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos con centrifugación suave ocasional. Las partículas de oro recubiertas de ADN fueron centrifugadas brevemente, lavadas con 420 µL de etanol al 70% y luego con 420 µL de etanol al 100%. El gránulo final fue resuspendido en 110 µL de etanol al 100% y sometido a una sonicación breve (tres ráfagas de 3 segundos cada una, con un sonicador Branson 1450. Se extendieron en cada uno de los nueve macroportadores (BioRad, Hercules, California) partes alícuotas de 12,2 µL de las partículas de oro recubiertas con ADN y fueron usadas en ensayos de bombardeo usando un sistema BioRad PDS 1000/He. Las células de cultivo en suspensión fueron transformadas a una distancia diana de 9 cm usando discos de 24,2 MPa, y cada disco fue bombardeado 3 veces. Tras el bombardeo, las células fueron incubadas en la oscuridad a 28°C, primero durante 12 horas en G-N6 que contenía caldo de cultivo de D-sorbitol y D-manitol, luego en placas de G-N6 durante 36 horas adicionales. Las células fueron recogidas de las placas, transferidas a una membrana de filtro para eliminar el tampón y extraídas con 300 µL de tampón de extracción 2× CCLT LUC (Promega Corporation, Madison, Wisconsin). Después de la centrifugación, se recogieron aproximadamente 600 µL de extracto proteínico. Las concentraciones de proteína fueron estimadas usando el ensayo Bradford.

Se midieron la actividad enzimática de LUC (expresada en unidades de luciferasa (LU)/mg de proteína) y la actividad enzimática de GUS (expresada en unidades de actividad de GUS (GU)/ μ g de proteína) mediante los métodos encontrados, por ejemplo, en Maliga *et al.* (*Methods in Plant Molecular Biology. A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995). Las actividades relativas de los promotores del ensayo en constructos SCBV:LUC fueron comparadas normalizando los niveles de LUC con respecto a los niveles de GUS como la proporción de LUC/mg de proteína:GUS/ μ g de proteína.

Ejemplo 3

Plásmidos para el etiquetado de activación en plantas de maíz

Este ejemplo describe la generación de plásmidos superbinarios de *Agrobacterium*.

El sistema superbinario en un ejemplo especializado de un sistema de vector lanzadera/recombinación homóloga de *Agrobacterium* (Komari *et al.*, *Meth. Mol. Biol.* 343: 15- 41, 2006; Komari *et al.*, *Plant Physiol.* 114:1155-1160, 2007; véanse también la patente europea nº EP604662B1 y la patente estadounidense nº 7.060.876, cada una de las cuales es incorporada por referencia en su integridad). La cepa anfitriona de *Agrobacterium tumefaciens* empleada con el sistema superbinario es la LBA4404(pSB1). La cepa LBA4404(pSB1) alberga dos plásmidos que se duplican independientemente: pAL4404 y pSB1. El pAL4404 es un plásmido auxiliar derivado de un plásmido It que contiene un conjunto intacto de genes *vir* (del plásmido It pTiACH5), pero que no tiene ninguna región de ADN-T (y, por ello, ninguna secuencia de repetición de borde izquierdo y derecho de ADN-T). El plásmido pSB1 aporta un conjunto parcial adicional de genes *vir* derivados de pTiBo542. Un ejemplo de vector lanzadera usado en el sistema superbinario es el pSB11, que contiene un policonector de clonación que sirve como sitio de introducción para los genes destinados a la transformación de células vegetales, flanqueado por regiones de repetición de borde izquierdo y derecho de ADN-T. El vector lanzadera pSB11 no es capaz de replicación independiente en *Agrobacterium*, pero es mantenido de manera estable en el mismo como un plásmido cointegrante cuando es integrado en el pSB1 por medio de recombinación homóloga entre secuencias comunes presentes en el pSB1 y el pSB11. Así, se actúa de manera productiva en la región de ADN-T completamente modificada introducida en LBA4404(pSB1) en un vector pSB11 modificado y se la transfiere a células vegetales mediante proteínas Vir derivadas de dos fuentes plasmídicas It de *Agrobacterium* diferentes (pTiACH5 y pTiBo542). El sistema superbinario ha resultado ser particularmente útil en la transformación de especies vegetales monocotiledóneas (véanse Hiei *et al.*, *Plant J.* 6:271- 282, 1994, e Ishida *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 14:745-750, 1996).

Un plásmido de transformación para la producción de plantas de maíz etiquetadas de activación puede incluir un plásmido cointegrante formado por recombinación homóloga entre el plásmido superbinario pSB1 y pEPP1088, teniendo una cadena principal del vector pSB11 (véanse la patente europea nº EP604662B1 y la patente estadounidense nº 7060876, cada una de las cuales es incorporada por la presente por referencia). El plásmido cointegrante es denominado pSB1::pEPP1088 o vector ZeaTAG. La estructura del pEPP1088 fue validada mediante análisis enzimático de restricción y determinación de secuencias de ADN de regiones seleccionadas del constructo. El pEPP1088 contiene, situadas entre las secuencias de borde izquierdo (LB) y derecho (RB) de ADN-T proporcionadas por el plásmido pSB11, 4 copias de las secuencias potenciadoras de SCBV del pb -502 al -222 descritas anteriormente y un gen marcador seleccionable que comprende un promotor del gen actina del arroz (*Oryza sativa*) con el intrón 1 y la 5' UTR asociados (esencialmente dado a conocer como las bases 12 a 1411 del nº de acceso EU155408.1 de GenBank, que es incorporado por la presente por referencia en su integridad), una secuencia para una proteína AAD-1 de tolerancia a herbicidas, según da a conocer la solicitud de patente estadounidense nº 20090093366, y una secuencia terminadora 3' UTR procedente del gen lipasa del maíz esencialmente dado a conocer como las bases 921 a 1277 del nº de acceso gb|L35913.1|MZELIPASE de GenBank y en la patente estadounidense nº 7.179.902, cada uno de los cuales es incorporado por la presente por referencia en su integridad.

El ADN-T del pEPP1088 (y presente en pSB1::pEPP1088) se integra en ubicaciones aleatorias en los cromosomas del maíz cuando es introducido en las células de maíz mediante transformación arbitrada por *Agrobacterium*. La selección de células transformadas de maíz es proporcionada por el gen marcador seleccionable AAD1 expresado constitutivamente en el ADN-T. El ADN-T que porta copias en tándem del potente elemento activador del potenciador transcripcional de SCBV del pb -502 al -222 provoca, por lo tanto, la expresión aberrante de genes nativos cercanos al sitio de integración, proporcionando, en algunos casos, nuevos rasgos identificables a las plantas regeneradas de tejidos transformados. Hay disponibles métodos modernos de biología molecular que facilitan el aislamiento y la identificación de los genes afectados cerca del sitio aceptor, permitiendo así un aprovechamiento adicional de los genes aislados.

Ejemplo 4

Transformación del maíz arbitrada por *Agrobacterium*

Este ejemplo describe la generación de una transformación del maíz arbitrada por *Agrobacterium*.

Producción de embriones inmaduros. Se plantaron semillas de una línea endogámica B104 en tiestos de 15 litros que contenían Sunshine Custom Blend® 160 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, Washington). Las plantas fueron

cultivadas en un invernadero usando una combinación de sodio a alta presión y lámparas de haluro metálico con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Para obtener embriones inmaduros para la transformación, se llevaron a cabo polinizaciones endogámicas. Los embriones inmaduros fueron aislados de 10 a 13 días tras la polinización cuando los embriones tenían un tamaño de aproximadamente 1,4 a 2,0 mm.

5 *Infección y cocultivo.* Se esterilizaron en superficie mazorcas de maíz sumergiéndolas en lejía comercial al 50% con Tween 20 (1 o 2 gotas cada 500 mL) durante 10 minutos y fueron enjuagadas tres veces con agua estéril. Se preparó una suspensión de células de *Agrobacterium* que contenía un plásmido cointegrante de un vector superbinario transfiriendo 1 o 2 asas de bacterias cultivadas en un medio sólido YEP de cultivo que contenía 50 mg/L de espectinomicina, 10 mg/L de rifampicina, y 50 mg/L de estreptomina a 28°C durante 3 días o 25°C durante
10 4 días en 5 mL del caldo líquido de cultivo de infección (sales MS, vitaminas MS modificadas según ISU, 3,3 mg/L de dicamba, 68,4 g/L sacarosa, 36 g/L glucosa, 700 mg/L de L-prolina, pH 5,2) que contenía 100 µM de acetosiringona. La solución fue pipeteada ascendente y descendientemente con cuidado usando una pipeta estéril de 5 mL hasta que se logró una suspensión uniforme, y la concentración fue ajustada a una densidad óptica de 0,3 a 0,5 a 600 nm (OD₆₀₀) usando un densímetro celular Ultrospec 10 (GE Healthcare/Amersham Biosciences, Piscataway, Nueva Jersey). Los embriones inmaduros fueron aislados directamente introduciéndolos en un tubo microcentrifugador que contenía 2 mL del caldo de cultivo de infección. El caldo de cultivo fue retirado y remplazado dos veces con de 1 a 2 mL de un caldo de cultivo de infección nuevo, luego retirado y remplazado con 1,5 mL de la solución de *Agrobacterium*. La solución de *Agrobacterium* y embriones fue incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego transferida a un medio de cocultivo que contenía sales MS, vitaminas MS modificadas según ISU, 3,3 mg/L de dicamba, 30 g/L sacarosa, 700 mg/L de L-prolina, 100 mg/L de mioinositol, 100 mg/L de hidrolizado enzimático de caseína, 15 mg/L de AgNO₃, 100 µM acetosiringona, y de 2,3 a 3 g/L Gelzan™ (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri), a pH 5,8. La incubación de cocultivo duró de 3 a 4 días a 25°C en condiciones ya fuera de oscuridad o de luz fluorescente blanca durante 24 horas (aproximadamente 50 µEm⁻²s⁻¹).

25 *Reposo y selección.* Después del cocultivo, los embriones fueron transferidos a un medio de cultivo de reposo a base de MS sin selección que contenía sales MS, vitaminas MS modificadas según ISU, 3,3 mg/L de dicamba, 30 g/L sacarosa, 700 mg/L de L-prolina, 100 mg/L de mioinositol, 100 mg/L de hidrolizado enzimático de caseína, 15 mg/L de AgNO₃, 0,5 g/L de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico monohidratado MES (*PhytoTechnology Laboratories*®, Lenexa, Kansas), 250 mg/L de carbenicilina y 2,3 g/L de Gelzan™, a pH 5,8. Se continuó la incubación durante 7 días a 28°C en condiciones ya fuera de oscuridad o de luz fluorescente blanca durante 24 horas (aproximadamente 50 µEm⁻²s⁻¹). Tras el periodo de reposo de 7 días, los embriones fueron transferidos a un medio selectivo de cultivo. Para la selección de tejidos de maíz transformado con un plásmido superbinario que contenía un gen marcador seleccionable AAD1 expresable en la planta, se usó el medio (anterior) de cultivo de reposo a base de MS complementado con haloxifop. Los embriones fueron transferidos, en primer lugar, a un medio de cultivo de selección que contenía 100 nM de haloxifop e incubados durante 1 a 2 semanas, y luego transferidos a
35 500 nM de haloxifop e incubados durante 2 a 4 semanas adicionales. Los aislados transformados se obtuvieron en el curso de aproximadamente 5 a 8 semanas a 28°C en condiciones ya fuera de oscuridad o de luz fluorescente blanca durante 24 horas (aproximadamente 50 µEm⁻²s⁻¹). Se hizo acopio de los aislados recuperados transfiriéndolos a un medio de cultivo de selección nuevo a intervalos de 1 a 2 semanas para su regeneración y un análisis ulterior.

40 Los expertos en la técnica de la transformación del maíz entenderán que hay disponibles otros métodos de selección de plantas transformadas cuando se usan otros genes marcadores seleccionables expresables en una planta (por ejemplo, genes de tolerancia a los herbicidas).

45 *Prerregeneración.* Tras el procedimiento de selección, los cultivos expuestos al régimen de luz de 24 horas fueron transferidos a un medio de cultivo de prerregeneración a base de MS que contenía sales MS, vitaminas MS modificadas según ISU, 45 g/L de sacarosa, 350 mg/L de L-prolina, 100 mg/L de mioinositol, 50 mg/L de hidrolizado enzimático de caseína, 1 mg/L de AgNO₃, 0,25 g/L de MES, 0,5 mg/L de ácido naftalenacético, 2,5 mg/L de ácido ascórbico, 1 mg/L de 6-bencilaminopurina, 250 mg/L de carbenicilina, 2,5 g/L de Gelzan™ y 500 nM de haloxifop, a pH 5,8. La incubación continuó durante 7 días a 28° en condiciones de luz fluorescente blanca durante 24 horas (aproximadamente 50 µEm⁻²s⁻¹).

50 *Regeneración y aislamiento de plántulas.* Para la regeneración, los cultivos fueron transferidos a un medio de cultivo de regeneración primaria a base de MS que contenía sales MS, vitaminas MS modificadas según ISU, 60 g/L de sacarosa, 100 mg/L de mioinositol, 125 mg/L de carbenicilina, 2,5 g/L de Gelzan™ y 500 nM de haloxifop, a pH 5,8. Después de 2 semanas a 28° en condiciones de luz fluorescente blanca durante 24 horas (aproximadamente 50 µEm⁻²s⁻¹), los tejidos fueron transferidos a un medio de cultivo de regeneración secundaria a base de MS compuesto de sales MS, vitaminas MS modificadas según ISU, 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de mioinositol, 3 g/L de Gelzan™, a pH 5,8, con o sin 500 nM de haloxifop. La regeneración/selección continuó durante 2 semanas a 28° en condiciones de luz fluorescente blanca ya fuera de 16 horas o de 24 horas (aproximadamente 50 µEm⁻²s⁻¹). Cuando las plántulas alcanzaron de 3 a 5 cm de longitud, fueron escindidas y transferidas a un medio de cultivo de regeneración secundaria (como anteriormente, pero sin haloxifop) e incubadas a 25° en condiciones de luz fluorescente blanca durante 16 horas (aproximadamente 50 µEm⁻²s⁻¹) para permitir un crecimiento y un desarrollo
60 adicionales de los brotes y las raíces.

Producción de semillas. Las plantas fueron trasplantadas a un medio de cultivo no férreo Metro-Mix® 360 (Sun Gro Horticulture) y aclimatadas en una sala de cultivo. Las plantas fueron trasplantadas a una mezcla de tierra Sunshine Custom Blend 160 y cultivadas en el invernadero hasta su floración. Se llevaron a cabo polinizaciones controladas para la producción de semillas.

5 Ejemplo 5

Actividad del potenciador de SCBV en células de maíz transformadas de manera estable

Se aisló ADN genómico (Qiagen DNeasy® Plant Mini Kit; Qiagen, Germantown, Maryland) de diez plantas T₀ regeneradas a partir de embriones inmaduros B104 transformados, y las ubicaciones genómicas de los ADN-T integrados transferidos de pSB1::pEPP1088 se determinaron por clonación de PCR inversa y secuenciación del ADN de los productos amplificados por PCR inversa. Las identidades de los genes representados por las regiones codificantes flanqueantes situadas a menos de 10 kb del potenciador 4XSCBV fueron determinadas mediante búsquedas de BLAST (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410, y Karlin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264-2268, 1990) usando las secuencias flanqueantes como secuencias de consulta. Los análisis de los resultados de BLAST revelaron que los ADN-T y, por ende, los potenciadores 4XSCBV se integraron en una ubicación genómica diferente en cada una de las 10 líneas y, por lo tanto, que los potenciadores 4XSCBV están flanqueados por genes diferentes en cada línea (Tabla 1).

Se aisló en ARN total (Qiagen RNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen, Germantown, Maryland) a partir de tejidos de hojas de las diez líneas T₀. La acumulación de transcritos de los genes flanqueantes identificados fue comparada entre las plantas T₀ apropiadas y las plantas de control no transformadas mediante transcripción inversa y RT-PCR (PCR en tiempo real), usando cebadores específicos para los genes relevantes que flanqueaban los potenciadores 4XSCBV. Como control, también se determinó la acumulación de transcritos para el gen GAPDH endógeno.

Los productos de RT-PCR revelaron una mayor acumulación de transcritos que se originaban de tres de los diferentes genes flanqueantes de estas líneas. Los potenciadores 4XSCBV están situados 2,6 kb y 2,8 kb corriente arriba de los genes flanqueantes afectados en dos de las líneas T₀, y 478 pb corriente abajo del gen flanqueante afectado en la tercera línea T₀. Así, estos resultados indican que los potenciadores 4XSCBV distribuidos por el ADN-T provocan una mayor acumulación, independiente de las cadenas, de los transcritos de genes cercanos al sitio de integración. La Tabla 1 indica los genes flanqueantes identificados y los resultados de los análisis de sus niveles de transcripción.

Tabla 1. Efecto del potenciador 4XSCBV sobre la acumulación de ARN de los genes flanqueantes en 10 plantas T₀

ID de la planta T ₀	Distancia al 4XSCBV (pb)	Nombre del gen flanqueante	Acumulación de ARN
ZT00031845	1197	Bucle P que contiene hidrolasas de NTP	Sin cambio
ZT00032132	5' UTR	Una proteína auxiliar de proteínas vesiculares de fusión	Sin cambio
ZT00036435	2644	Helicasa de tipo caja DEAD	Mayor
ZT00034545	1972	Proteína nuclear de tipo grupal de gran movilidad	Sin cambio
ZT00036729	EST	Proteína desconocida	Sin cambio
ZT00035749	2818	Proteína desconocida (GRMZM2G115661)	Mayor
ZT00033904	830	Proteína desconocida	Sin cambio
ZT00036426	79	Proteína ribosómica L22/L17; la planta T ₀ es alta	Sin cambio
ZT00036426	2150	Péptido señal	Sin cambio
ZT00035050	478 del extremo 3'	Gen desconocido (GRMZM2G139336)	Mayor

Un experto en los campos de la genética del maíz y de la biología molecular vegetal se dará cuenta de que, dependiendo de la naturaleza de los genes afectados, la mayor expresión de los genes adyacentes inducida por los potenciadores 4XSCBV conferirá en algunos casos a la planta transgénica rasgos nuevos y valiosos. Colectivamente, las plantas que tienen los potenciadores 4XSCBV representan una población macada como ZeaTAG. Los rasgos pueden ser resultado de una mayor acumulación de la proteína codificada *per se* por el gen afectado; por ejemplo, una mayor acumulación de una proteína nutricionalmente deseable en la semilla, o resultado de un efecto corriente abajo por el que el producto génico del gen inmediatamente afectado controla la expresión de un gen o de una multitud de genes adicionales (como en el caso, por ejemplo, de genes activadores/represores de la transcripción). La naturaleza aleatoria de la ubicación de integración de los ADN-T introducidos, unida a métodos estándar de cultivo vegetal, puede ser usada para establecer grandes poblaciones de plantas que comprendan una biblioteca de plantas que contengan un ADN-T que tenga elementos activadores situados a una distancia efectiva de la totalidad o de la mayoría de los genes dentro del genoma del maíz y, así, proporciona la oportunidad de que la totalidad o la mayoría de los genes del maíz sean activados transcripcionalmente.

La evaluación a escala de planta de fenotipos de importancia económica es posible en entornos de cámara de cultivo, invernadero o campo. Según se muestra aquí, métodos de biología molecular tales como PCR inversa permiten el aislamiento de un ADN-T integrado y de tramos sustanciales de ADN genómico flanqueantes del ADN-T integrado procedentes de plantas que presentan un fenotipo deseable. Además, métodos tales como técnicas de

5 paseo genómico permiten la determinación de regiones aún más extensas de una secuencia de ADN genómico, permitiendo así la identificación de los genes presentes en la proximidad de los elementos activadores introducidos. Métodos de alto rendimiento tales como el análisis de micromatrices y métodos analíticos más específicos a los genes permiten la identificación y la cuantificación de los niveles de transcritos afectos. Así, los genes candidatos implicados en los rasgos agronómicos relevantes pueden ser identificados, aislados y caracterizados adicionalmente y aprovechados para proporcionar variedades nuevas y valiosas de cosechas.

10 Por el contrario, el nuevo rasgo puede ser resultado de la alteración de la función génica del maíz debido a la integración del ADN-T que tiene los potenciadores 4XSCBV en la región codificante o en regiones del gen del maíz reguladoras de la expresión. Si es así, el ADN-T que tiene los potenciadores 4XSCBV y las regiones genómicas circundantes puede ser aislado y caracterizado ulteriormente.

Ejemplo 6

Evaluación genética directa de la población ZeaTAG

Este ejemplo describes la evaluación genética directa de la población ZeaTAG en cuanto a fenotipos alterados.

Evaluaciones al estrés por sequía

15 Para identificar líneas ZeaTAG que contienen mutaciones que confieren tolerancia a la sequía, se plantan en un campo plantas provenientes de eventos ZeaTAG individuales. Se retira el agua para provocar estrés por sequía durante la fase reproductiva del ciclo de desarrollo, aproximadamente de 2 semanas antes de la floración a aproximadamente 2 semanas después de la floración. El objetivo es lograr 4 semanas del periodo de estrés en la fase de floración. Se usa un modelado medioambiental para predecir una demanda precisa de evapotranspiración del maíz en función de la monitorización de la humedad del suelo y de datos climáticos (temperatura del aire, déficit de presión de vapor, velocidad del viento e irradiación neta). Las plantas son monitorizadas en busca de síntomas de sequía, tales como el enrollamiento de las hojas por observación visual, una mayor temperatura de las hojas por termómetros de infrarrojos, fotosíntesis reducida por fluorescencia clorofílica y rendimiento reducido por la medición de la producción de cereal. Las plantas que presentan un enrollamiento de hojas significativamente menor, menor temperatura de las hojas, mayores tasas de fotosíntesis o tienen más producción en condiciones de estrés hídrico son identificadas y usadas en evaluaciones subsiguientes.

30 Los eventos ZeaTAG que presentan una tolerancia a la sequía significativamente mayor son plantados en un ensayo duplicado de campo para confirmar el fenotipo tolerante a la sequía. Estos eventos son plantados en un patrón de bloques divididos de forma aleatoria con al menos 3 réplicas. Un bloque es regado con agua suficiente para impedir el estrés hídrico. El otro bloque es cultivado en condiciones deficientes de agua, según se ha descrito en lo que antecede. Las plantas son monitorizadas en busca de enrollamiento de hojas, mayor temperatura de las hojas, menor fotosíntesis y menor producción, tal como se ha descrito anteriormente. Se considera que las plantas con enrollamiento de hojas significativamente menor, menor temperatura de las hojas, mayor fotosíntesis o mayor producción que las plantas de control no transformadas han superado la evaluación secundaria.

Evaluaciones de eficacia en el uso de nitrógeno

40 Para identificar eventos ZeaTAG con eficacia en el uso de nitrógeno mayor que las plantas no transgénicas de control, se lleva a cabo una evaluación primaria. Se cultivan en el campo en condiciones deficientes de nitrógeno plantas que contienen aproximadamente 40.000 eventos que contienen ZeaTAG. Las plantas son cultivadas en campos con menos de 39,23 kg de N por hectárea. Las plantas son monitorizadas en busca de clorosis por inspección visual, mayor temperatura de las hojas por termómetros infrarrojos y menor producción por cosecha de cereal. Estos parámetros son comparados con plantas no transgénicas de control. Las líneas ZeaTAG que presentan menos clorosis, menor temperatura de las hojas, mayores tasas fotosintéticas o mayores producciones que las líneas no transgénicas de control son evaluadas en evaluaciones secundarias.

45 Como evaluación secundaria, los eventos ZeaTAG que presentan una eficacia significativamente mayor en el uso de nitrógeno son plantadas en un ensayo de campo con replicación. Estos eventos son plantados en un patrón de bloques divididos de forma aleatoria con al menos 3 réplicas. Un bloque es regado con suficiente fertilizante nitrogenado para impedir el estrés por falta de nitrógeno. El otro bloque es cultivado en condiciones deficientes de nitrógeno, según se ha descrito en lo que antecede. Las plantas son monitorizadas en busca de clorosis por inspección visual, mayor temperatura de las hojas por termómetros infrarrojos y menor producción por cosecha de cereal. Se considera que las líneas con significativamente menos clorosis, menor temperatura de las hojas, mayor fotosíntesis o mayor producción que las líneas no transformadas de control han superado la evaluación secundaria.

55 Una vez que el fenotipo ha sido confirmado en la evaluación secundaria, el fenotipo es sujeto a un ensayo en busca de una vinculación genética con la inserción de ZeaTAG evaluando la progenie de un cruce entre la línea parental no transformada y la línea ZeaTAG. Cuando las plantas que contienen el elemento ZeaTAG presentan el fenotipo y las plantas que no contienen el elemento ZeaTAG no lo hacen, se considera que el fenotipo está genéticamente vinculado con el inserto y que es probable que sea causado por el elemento ZeaTAG. Para identificar genes cuya

expresión pueda estar afectada por el elemento ZeaTAG, se determina la ubicación del elemento ZeaTAG dentro del genoma.

La ubicación genómica del elemento ZeaTAG se determina aislando secuencias genómicas flanqueantes del elemento ZeaTAG y comparando estas secuencias con la secuencia genómica del maíz. Las secuencias flanqueantes del elemento ZeaTAG pueden ser determinadas mediante varias técnicas biológicas moleculares, incluyendo, sin limitación, PCR inversa (iPCR) (Ochman *et al.*, *Genetics*, 120: 621-623/1988), TAIL (Liu *et al.*, *Plant Journal* 8: 457-463, 1995) y PCR arbitrada por ligadura (LMPCR) Prod'hom *et al.*, *FEMS Microbial Lett.* 158: 75-81, 1998). Estas secuencias son comparadas con secuencias genómicas mediante herramientas de alineamiento de secuencias, tales como BLAST, para identificar la ubicación del elemento ZeaTAG dentro del genoma.

Los genes que flanquean el elemento ZeaTAG, o interrumpidos por él, se determinan examinando el genoma anotado. La transcripción de los genes que flanquean el elemento ZeaTAG puede ser responsable del fenotipo mutante. Estos genes pueden ser sobreexpresados en maíz de la forma natural para verificar si pueden conferir un fenotipo similar. Para verificar esto, los genes son clonados en vectores de transformación activados por promotores fuertes o por su propio promotor con secuencias potenciadoras que los flanquean para potenciar la transcripción. Estos vectores son introducidos por transformación en el maíz de la forma natural y las plantas resultantes de esta transformación son sometidas a ensayo en busca del fenotipo.

De manera similar, los genes interrumpidos por el elemento ZeaTAG pueden causar el fenotipo. Para confirmar que un gen interrumpido por el elemento es responsable del fenotipo, la expresión del gen puede ser alterada y las plantas que contienen esta alteración pueden ser sometidas a ensayo en busca del fenotipo. La alteración de la expresión de genes específicos puede lograrse mediante varios métodos conocidos para los expertos en la técnica, incluyendo, sin limitación, ARN antisentido, microARN artificiales e identificación de mutaciones en el gen mediante TILLING.

Ejemplo 7

Evaluación genética inversa de la población ZeaTAG

Este ejemplo describe la evaluación genética inversa de la población ZeaTAG en busca de mutaciones.

La evaluación genética inversa es la búsqueda de mutaciones que afectan a genes específicos y, subsiguientemente, el sometimiento a ensayo de la línea identificada para un fenotipo mutante. La población ZeaTAG puede ser usada de varias formas en análisis genéticos inversos, incluyendo, sin limitación, la generación de una colección de etiquetas de secuencias flanqueantes para la población (Jeong *et al.*, *The Plant Journal* 45: 123-132, 2006) y la generación de una colección indexada de muestras agrupadas de ADN de la población ZeaTAG (May *et al.*, *Molecular Biotechnology* 20: 209-221, 2002).

Se genera una colección de etiquetas de secuencias flanqueantes tomando muestras del tejido de hojas de la población, aislando ADN de cada una, identificando las secuencias que flanquean el inserto y almacenando las secuencias en una base de datos susceptible de búsqueda en la que las secuencias están ligadas a los eventos de las que procedieron. El ADN genómico es aislado utilizando el Qiagen DNAeasy Plant Kit (Qiagen, Germantown, Maryland) usando el protocolo recomendado por el fabricante. Las secuencias que flanquean el inserto son identificadas usando PCR arbitrada por ligadura (Mueller *et al.*, *Science* 246: 780-786, 1989) modificada por Yephremov y Saedler (*Plant Journal* 21: 295-305, 2000). De forma resumida, el ADN genómico de una línea ZeaTAG es fragmentado mediante digestión por enzimas de restricción y desnaturalizado. Un cebador oligonucleótido biotinilado complementario de la secuencia en el extremo del elemento ZeaTAG es hibridado con el ADN fragmentado y extendido mediante ADN polimerasa. Se añaden a la mezcla microesferas magnéticas recubiertas de estreptavidina para unir fragmentos de ADN que contienen fragmentos de ADN extendidos de este cebador. Se liga al extremo desconocido un adaptador de ADN bicatenario de secuencia conocida. Estos fragmentos son amplificados por PCR usando oligonucleótidos complementarios de secuencias dentro del elemento ZeaTAG y del adaptador de ADN en el otro extremo. Entonces se determina la secuencia del fragmento de la PCR y se la correlaciona con la secuencia genómica del maíz mediante BLAST. Estas secuencias localizan el sitio de inserción del elemento ZeaTAG. Los genes a menos de ~10 kpb pueden ser regulados al alza por las secuencias potenciadoras dentro del elemento ZeaTAG.

Las plantas que contienen inserciones en o cerca de los genes que se hipotetiza que causan un fenotipo pueden ser identificados buscando la base de datos. Las plantas que contienen estos eventos pueden ser sometidas a ensayo en busca del fenotipo.

En vista de las muchas realizaciones posibles a las que pueden aplicarse los principios de la invención divulgada, debería reconocerse que las realizaciones ilustradas son únicamente ejemplos preferentes de la invención y no se debería interpretar que limiten el alcance de la invención. En vez de ello, el alcance de la invención está definido por las siguientes reivindicaciones.

Listado de Secuencias

- <110> Davies, John P.
Reddy, Vaka S.
Ainley, William M.
- 5 Thompson, Mark A.

- <120> POTENCIADOR VIRAL BACILIFORME DE LA CAÑA DE AZÚCAR (SCBV) Y SU USO EN LA GENÓMICA VEGETAL FUNCIONAL

- <130> 7896-84891-03

- <150> 61/402,570
- 10 <151> 2010-08-30

- <160> 1

- <170> PatentIn version 3.5

- <210> 1
- <211> 839
- 15 <212> DNA
- <213> Virus baciliforme de la caña de azúcar

- <400> 1

	aagcttattg aatggggaaa acaaattctt gatccattcc ccaaattcaa gaaggatatg	60
	tttgaagaa ctgaacatat catgatggca acacaagagc ctacgctact atgtggatgc	120
	aggaagcctg caatcatggt aacatcagga acaaggctta atcctcgtag aagattttac	180
	aagtgtgcc tgaatatctg ccaactgctgg tattgggcag atttacttga agaatacgtg	240
	caagagagga tcgaagattt catggttgaa aacttcgaca agaaagcaaa gctggatgaa	300
	ccaagttcat caaacgttca ccatgatgat tatgaagaac accgttcgag tgtcatcgac	360
	aggccaaggc caacagatga tcatttcaga ccatgggggg atgttacata ctggctgaat	420
	aaagaagcag aagagtgcc cacaaggggc gacaacgtcg aaggcgaga agacgcagtc	480
	gatctcactg acgtaagcaa tgacgaccag tggaggagat cgtaagcaat gacgatgga	540
	gcgtggagga cccatgaaag cactgagaag gcatctcaac tttcgggtgtg tgagtgcgca	600
	tcctatgcca tgctttgtac ctttgtagc tgtgtgtgtc cttttggcat ctgtgccact	660
	ttacctttgt cggccacgtt gcctttgctt agcatctacg caagcatagc gctcggctgg	720
	tgtgtgttcc ctctgcctat ataaggcatg gttgtatgac tcttactc atcggtagtt	780
	caccacatga gtatttgagt caagtttggc ttgaataata agaattacac ctttccgca	839

20

REIVINDICACIONES

1. Una región quimérica reguladora de la transcripción que comprende:
- 5 una o más copias del elemento potenciador viral baciliforme de la caña de azúcar (SCBV) mostrado de la posición 337 a la posición 618 de la SEQ ID NO: 1, o de un homólogo del mismo que tenga una identidad de al menos el 90% de la posición 337 a la posición 618 de la SEQ ID NO: 1; y, operativamente ligado a las mismas,
- un promotor heterólogo que comprende un sitio de unión de la ARN polimerasa y un sitio de iniciación de ARNm,
- 10 en la que, cuando se transcribe una secuencia de nucleótidos de interés bajo el control regulador de la región quimérica reguladora de la transcripción, la cantidad del producto de transcripción se potencia en comparación con la cantidad del producto de transcripción obtenida con la región quimérica reguladora de la transcripción que comprende el promotor y que no comprende la o las secuencias del potenciador de SCBV.
2. La región quimérica reguladora de la transcripción de la reivindicación 1 en la que el promotor es obtenido de la región corriente arriba de un gen de virus de una planta, de un gen bacteriano, de un gen fúngico, de un gen nuclear de una planta, de un gen extranuclear de una planta, de un gen de un invertebrado o de un gen de un vertebrado.
3. Un constructo que comprende la región reguladora de la transcripción de la reivindicación 1 operativamente ligada a una molécula de polinucleótido transcribible operativamente ligada a una molécula de polinucleótido de terminación de transcripción en 3'.
- 20 4. El constructo de la reivindicación 3 en el que dicha molécula de polinucleótido transcribible confiere un rasgo agronómico a una planta en la que se expresa.
5. Una planta transgénica transformada de manera estable con el constructo de la reivindicación 3, o una planta o un tejido vegetales transformados con el constructo de la reivindicación 3.
6. La planta transgénica de la reivindicación 5 en la que la molécula de polinucleótido transcribible confiere un rasgo agronómico a una planta en la que se expresa.
- 25 7. Una semilla de la planta transgénica de la reivindicación 5, comprendiendo la semilla el constructo.
8. La planta transgénica de la reivindicación 5, siendo la planta una planta de maíz.
9. Una célula vegetal transgénica que comprende la región quimérica reguladora de la transcripción de la reivindicación 1.
- 30 10. Un método de producción de una planta transgénica que comprende la transformación de una célula o un tejido vegetales con el constructo de la reivindicación 3.
11. El método de la reivindicación 10 en el que la planta transgénica es una dicotiledónea o una monocotiledónea.
12. La célula o el tejido vegetales de la reivindicación 5, siendo la célula o el tejido vegetales de una dicotiledónea o de una monocotiledónea.
- 35 13. Una célula vegetal, un fruto, una hoja, una raíz, un brote, una flor, una semilla, un esqueje u otro material reproductivo útil en la propagación sexual o asexual, plantas descendientes, incluyendo híbridos F1, plantas masculinas estériles y todas las demás plantas y los productos vegetales derivables de la planta transgénica de la reivindicación 6, comprendiendo la célula vegetal, el fruto, la hoja, la raíz, el brote, la flor, la semilla, el esqueje y otro material reproductivo útil en la propagación sexual o asexual, plantas descendientes, incluyendo híbridos F1, plantas masculinas estériles y todas las demás plantas y los productos vegetales el constructo de la reivindicación 3.
- 40 14. Una célula, un tejido o una planta de maíz que comprende una región quimérica reguladora de la transcripción que comprende
- 45 una o más copias del elemento potenciador viral baciliforme de la caña de azúcar (SCBV) mostrado de la posición 337 a la posición 618 de la SEQ ID NO: 1, o de un homólogo del mismo que tenga una identidad de al menos el 90% de la posición 337 a la posición 618 de la SEQ ID NO: 1; y, operativamente ligado a las mismas,
- un promotor heterólogo que comprende un sitio de unión de la ARN polimerasa y un sitio de iniciación de ARNm,
- 50 en la que la región quimérica reguladora de la transcripción es insertada en un genoma de la célula, el tejido o la planta de maíz en una ubicación aleatoria.

15. La célula, el tejido o la planta de maíz de la reivindicación 14 en que el potenciador de SCBV imparte una transcripción de una secuencia de interés de nucleótidos que está bajo el control regulador del potenciador de SCBV mejorada con respecto a la transcripción de la secuencia de interés de nucleótidos en ausencia del potenciador de SCBV.

5

FIG. 2A

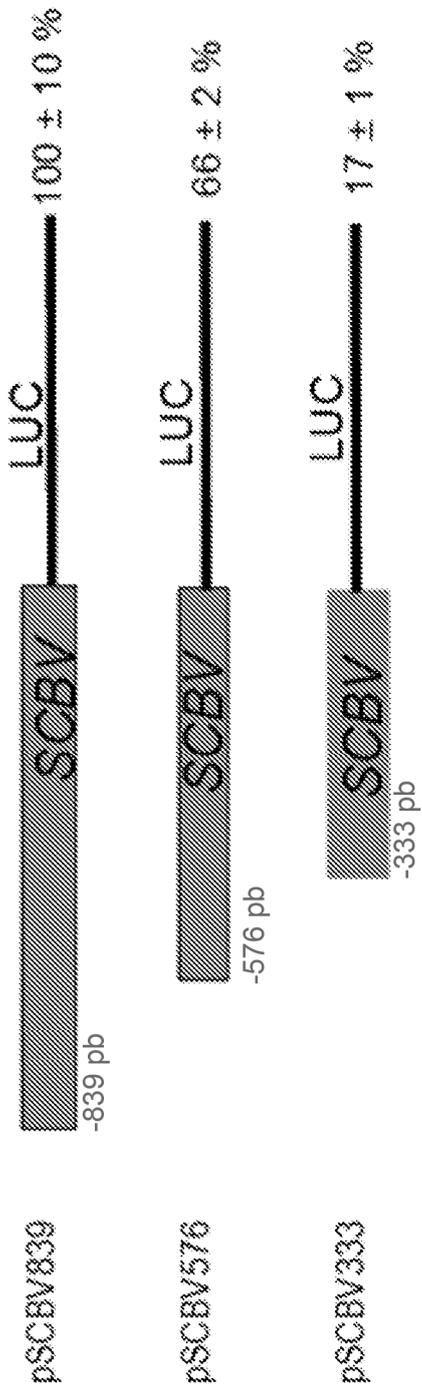
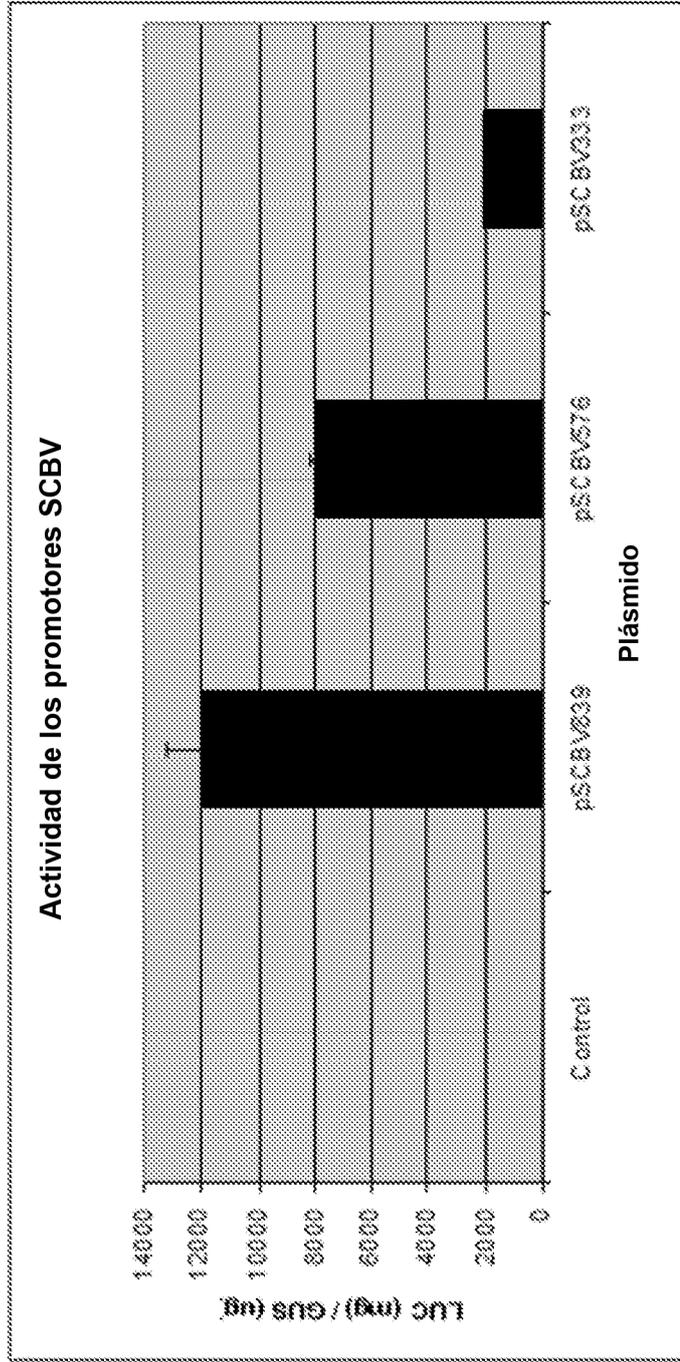
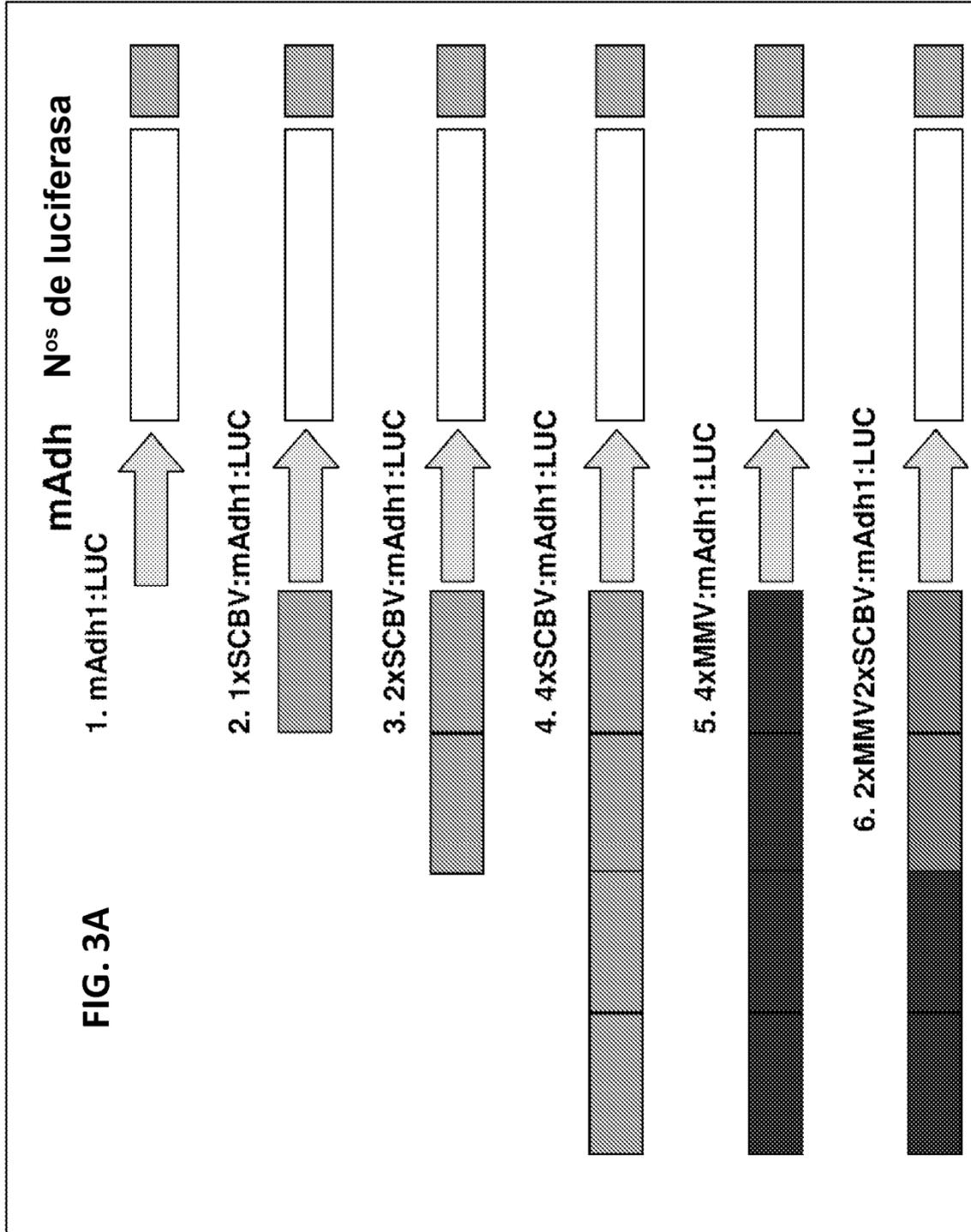


FIG. 2B





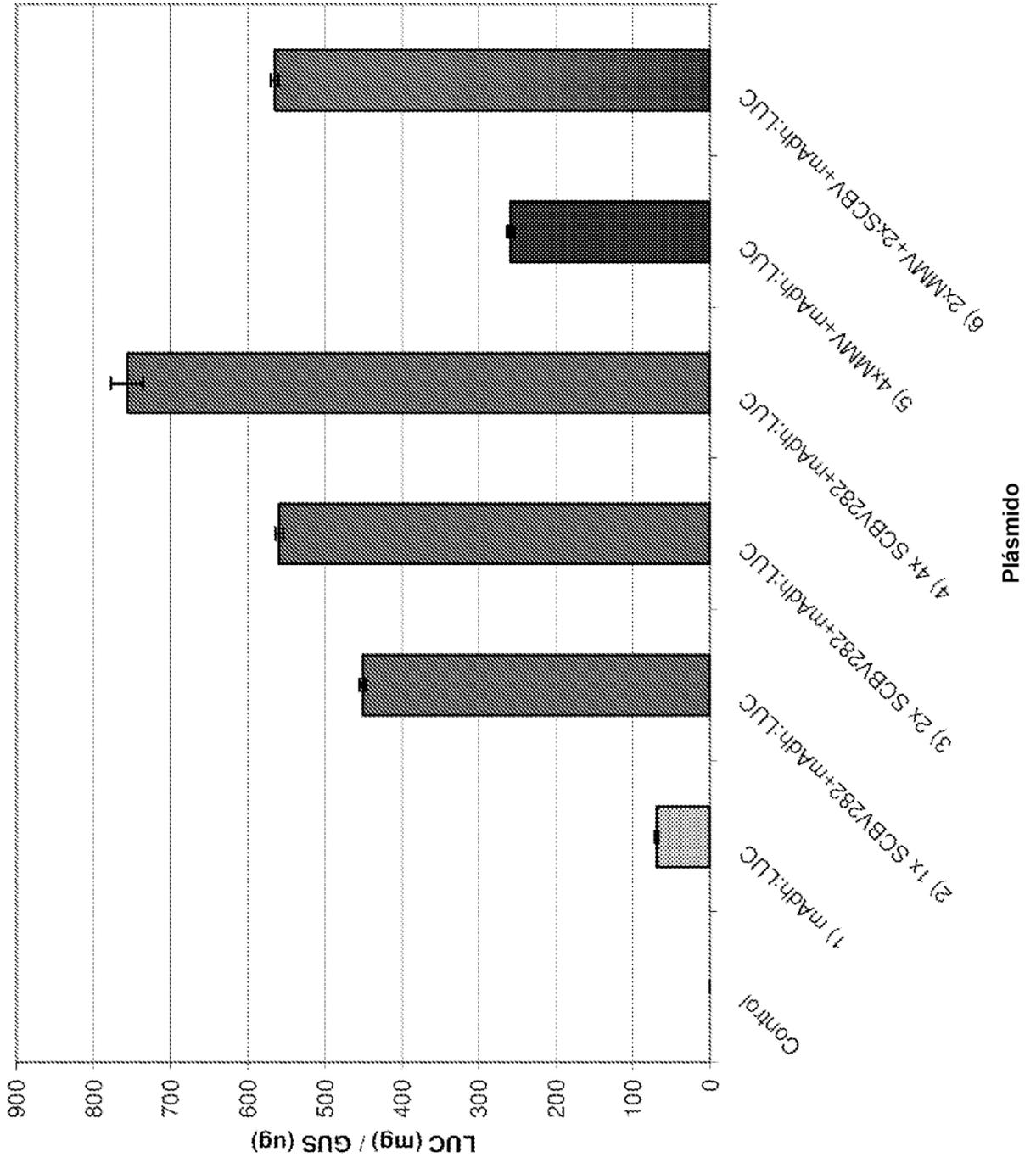


FIG. 3B

FIG. 4

