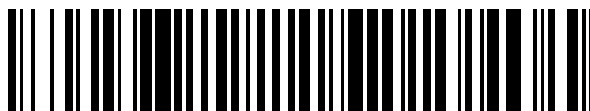


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 289**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014** **PCT/US2014/023291**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14150449**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014** **E 14719208 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018** **EP 2970405**

54 Título: **Promotores de la soja constitutivos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361790907 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
28.02.2019

73 Titular/es:

BAYER CROPSCIENCE LP (100.0%)
2 T.W. Alexander Drive, Room 1115, P.O. Box
12014
Research Triangle Park, NC 27709, US

72 Inventor/es:

ZHANG, SHIRONG

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 702 289 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

Promotores de la soja constitutivos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular de plantas, más específicamente, a la identificación y el uso de elementos reguladores en plantas.

10 Antecedentes de la invención

Actualmente, existe una gran demanda de plantas transgénicas que expresen productos proteicos biotecnológicamente importantes a un nivel alto o inducible. La manipulación de plantas de cultivo para alterar y/o mejorar las características fenotípicas (tales como la productividad o la calidad) requiere la expresión de genes heterólogos en tejidos vegetales. Dicha manipulación genética se ha hecho posible gracias a dos descubrimientos: la capacidad de transformar material genético heterólogo en una célula vegetal y la existencia de promotores que son capaces de impulsar la expresión del material genético heterólogo.

Entre los promotores más usados comúnmente están el promotor de la nopalina sintasa (NOS) (Ebert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:5745-5749 (1987)); el promotor de la octapina sintasa (OCS), los promotores de caulimovirus tales como el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 19S (Lawton et al., Plant Mol. Biol. 9:315-324 (1987)); el promotor de CaMV 35S (Odell et al., Nature 313:810-812 (1985)) y el promotor del virus del mosaico de la escrofularia 35S (Sanger et al., Plant Mol. Biol. 14:433-43 (1990)); el promotor fotoinducible de la subunidad pequeña del rubisco (Pellegrineschi et al., Biochem. Soc. Trans. 23(2):247-250 (1995)); el promotor de Adh (Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:6624-66280 (1987)); el promotor de la sacarosa sintasa (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:4144-4148 (1990)); el promotor del complejo génico R (Chandler et al., Plant Cell 1:1175-1183 (1989)); el promotor del gen de la proteína de unión a la clorofila a/b; y similares.

La identificación y el aislamiento de elementos reguladores útiles para una expresión intensa o inducible de genes en microorganismos y plantas sería beneficioso para el desarrollo de variedades comerciales de plantas transgénicas.

Sumario de la invención

Se proporcionan composiciones y métodos para regular la expresión génica en una planta. Las composiciones comprenden secuencias nucleotídicas de *Glycine max* y variantes de estas que inician la transcripción en una planta. Específicamente, se proporciona una región de iniciación transcripcional aislada a partir de un tonoplasto gamma y un gen de la membrana plasmática de *Glycine max*. Otras composiciones adicionales de la invención comprenden las secuencias nucleotídicas expuestas en la SEQ ID NO: 2, y variantes y fragmentos de estas. Las composiciones de la presente invención también incluyen casetes de expresión que comprenden un promotor de la invención unido funcionalmente a una secuencia nucleotídica heteróloga de interés. La invención proporciona además vectores que comprenden los casetes de expresión y plantas y células vegetales que tiene incorporados en sus genomas de forma estable un casete de expresión descrito anteriormente. Además, las composiciones incluyen semillas transgénicas de dichas plantas.

Unida funcionalmente al promotor existe una secuencia de interés que puede modificar el fenotipo de la planta. Dicha modificación puede incluir, por ejemplo, la modulación de la producción de un producto endógeno o puede incluir la producción de un producto de expresión exógeno para proporcionar una función o producto nuevo en la planta. Por ejemplo, se abarca una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica un producto génico que confiere resistencia a herbicidas o plagas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un casete de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: (a) la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 2; (b) una secuencia nucleotídica que comprende al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal; y (c) una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal. La presente invención proporciona además:

- una célula vegetal que tiene incorporada establemente en su genoma el casete de expresión de la invención;
- una célula vegetal que tiene incorporado de manera estable en su genoma el casete de expresión de la invención, en el que dicha secuencia nucleotídica está unida operativamente a un ácido nucleico heterólogo de interés;
- semilla transgénica que comprende el casete de expresión de la invención.

La invención proporciona también un método para expresar una secuencia nucleotídica en una planta,

comprendiendo dicho método introducir en una célula vegetal un casete de expresión que comprende un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo de interés, en el que dicho promotor comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: (a) la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 2; (b) una secuencia nucleotídica que comprende al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal; y (c) una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal; y, regenerar una planta transformada a partir de dicha célula vegetal, en la que dicha planta se ha incorporado de manera estable en su genoma, dicho casete de expresión.

La invención proporciona además un método para expresar una secuencia nucleotídica en una célula vegetal, comprendiendo dicho método introducir en una célula vegetal un casete de expresión que comprende un promotor unido operativamente a un ácido nucleico heterólogo de interés, en el que dicho promotor comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: (a) la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 2; (b) una secuencia nucleotídica que comprende al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal; y (c) una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un nivel de expresión alto de luciferasa cuando está bajo el control de los promotores Pbdc6 (SEQ ID NO: 1) y Pbdc7 (SEQ ID NO: 2).

Descripción detallada

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para regular la expresión génica en plantas o células vegetales. Las composiciones de la presente invención comprenden secuencias nucleotídicas nuevas para los promotores de la soja. En particular, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico promotoras aisladas que comprenden la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 2, así como fragmentos y variantes de esta que comprende al menos 50 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2 o que tienen un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y que pueden iniciar la transcripción constitutiva en una célula vegetal. Además, se proporcionan plantas, células vegetales y semillas transformadas.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un casete de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: (a) la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 2; (b) una secuencia nucleotídica que comprende al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal; y (c) una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal.

Las secuencias promotoras de la invención, cuando se ensamblan dentro de una construcción de ADN con el fin de que el promotor se una funcionalmente a una secuencia nucleotídica de interés, impulsan la expresión de la secuencia nucleotídica en las células de un organismo transfectado de forma estable con dicha construcción de ADN, específicamente, células vegetales. Las secuencias promotoras también son útiles como sondas para el aislamiento de otras secuencias promotoras o genes de la soja, tales como marcadores moleculares y similares.

Los métodos para expresar una secuencia nucleotídica en una planta comprenden introducir en células vegetales un casete de expresión que comprende un promotor de la invención unido funcionalmente a una secuencia nucleotídica de interés y regenerar una planta transformada a partir de la célula vegetal.

Los artículos “un”, “uno” y “una” se usan en la presente memoria para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa uno o más elementos.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “molécula de ácido nucleico” pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero es preferiblemente ADN bicatenario.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” o “purificada”, o porción biológicamente activa de la misma, está sustancialmente exenta de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o está sustancialmente exenta de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. Preferiblemente, un ácido nucleico “aislado” está exento de secuencias (preferiblemente secuencias que codifican proteínas) que flanquean de forma natural el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual deriva el ácido

nucleico. A efectos de la invención, “aisladas” cuando se usa en referencia a moléculas de ácido nucleico excluye a cromosomas aislados. Por ejemplo, en varias realizaciones, la molécula promotora puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencia nucleotídica que flanquea de forma natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual deriva el ácido nucleico. Varios aspectos de la invención se describen en mayor detalle en las siguientes subsecciones.

Moléculas de ácido nucleico aisladas y variantes y fragmentos de las mismas

Las secuencias nucleotídicas de la presente invención incluyen las secuencias promotoras expuestas en la SEQ ID NO: 2, y variantes de esta que comprende al menos 50 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2 o que tienen un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y que pueden iniciar la transcripción constitutiva en una célula vegetal. Pro “promotor” se entiende una secuencia de ácido nucleico que tiene la función de dirigir la transcripción de una secuencia codificante en dirección 3'. Un promotor generalmente comprende una secuencia de ADN homologa a la 5'-TATAAT-3' de consenso (caja TATA) en aproximadamente 10-30 pares de bases en 5' con respecto al sitio de iniciación de la transcripción (cap) que es capaz de dirigir la ARN polimerasa para iniciar la síntesis del ARN. Los promotores pueden comprender además otras secuencias de reconocimiento, generalmente en dirección 5' o en 5' con respecto a la caja TATA, denominadas elementos promotores en dirección 5', que influyen en la velocidad de iniciación de la transcripción. Estos incluyen la caja CAAT, que a menudo se encuentra en aproximadamente 30 a 70 pares de bases en 5' con respecto a la caja TATA y que tiene homología con la 5'-CCAAT-3' canónica (Breathnach and Chambon (1981) Ann. Rev. Biochem. 50:349-383). En las plantas, la caja CAAT algunas veces se reemplaza por una secuencia conocida tal como la caja AGGA, una región que tiene residuos de adenina que flanquean simétricamente el triplete G(oT)NG (Messing et al. (1983), en Genetic Engineering of Plants, T. Kosuge, C. Meredith and A. Hollaender (eds.), Plenum Press, Nueva York, páginas 211- 227). Estos elementos, junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras de la transcripción y la traducción (también denominadas “secuencias control”), son necesarias para la expresión de una secuencia de ADN de interés. Los métodos para aislar e identificar elementos reguladores no descritos en la presente memoria, tales como potenciadores y elementos responsables de la expresión tisular o temporal de la región codificante, se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes US-5.635.618; US-6.218.140; US-6.303.370; US-6.310.197 y US-6.355.864.

Por “promotor nuclear” se entiende un promotor sin elementos promotores. Un promotor nuclear contiene secuencias nucleotídicas esenciales para la función promotora, incluida la caja TATA y el sitio de iniciación de la transcripción. Dicha región está presente normalmente, con alguna variación, en la mayoría de los promotores. La región promotora nuclear a menudo se denomina región promotora mínima debido a que es funcional por sí misma para promover un nivel basal de transcripción. La secuencia promotora nuclear para Pbdc6 corresponde a aproximadamente los nucleótidos 29 a 318 de la SEQ ID NO: 1; la TATA corresponde a aproximadamente los nucleótidos 288 a 296 de la SEQ ID NO: 1; y el sitio de iniciación de la traducción corresponde a la posición del nucleótido 318 de la SEQ ID NO: 1. En varias realizaciones, la secuencia promotora nuclear para Pbdc7 corresponde a aproximadamente los nucleótidos 1341 a 1643 de la SEQ ID NO: 2; la TATA corresponde a aproximadamente los nucleótidos 1603 a 1608 de la SEQ ID NO: 2; y el sitio de iniciación de la traducción corresponde a la posición de nucleótido 1643 de la SEQ ID NO: 2. El experto en la materia entenderá que la región promotora nuclear puede diferir de las posiciones mencionadas anteriormente en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos en dirección 5' o en dirección 3', y que se pueden tolerar variaciones dentro de la secuencia promotora nuclear.

Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de las secuencias promotoras divulgadas, también abarcadas por la presente invención, comprenden al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 o tienen al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, y las cuales pueden iniciar la transcripción constitutiva en una célula vegetal. Por “fragmento” se entiende una porción de la secuencia promotora. Un fragmento de una secuencia nucleotídica puede ser biológicamente activo y, por consiguiente, ser capaz de iniciar la transcripción de una secuencia nucleotídica unida funcionalmente en una planta. También se divulga un fragmento que puede usarse como una sonda de hibridación o cebador de PCR usando métodos divulgados más adelante. Los ensayos para determinar si dichos fragmentos disminuyen los niveles de expresión o altera la naturaleza de la expresión, es decir, una expresión constitutiva o inducible, se conocen en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de una secuencia promotora pueden comprender al menos aproximadamente 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600 nucleótidos contiguos, o hasta el número de nucleótidos presentes en una secuencia promotora de longitud completa divulgada en la presente memoria (por ejemplo, 1688 nucleótidos para la SEQ ID NO: 2) dependiendo del uso previsto. Por nucleótidos “contiguos” se entiende residuos de ácido nucleico que son inmediatamente adyacentes entre sí. Los fragmentos biológicamente activos de los promotores de la presente invención conservarán la actividad promotora (es decir, la iniciación de la transcripción constitutiva). Por “conservar la actividad promotora” se entiende que el fragmento tendrá al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 70 %, o al menos aproximadamente 80 % de la actividad promotora del promotor de longitud completa. Una porción biológicamente activa de un promotor puede prepararse aislando una porción de una de las secuencias nucleotídicas promotoras de la invención y evaluando la actividad de dicha porción del promotor. Los

métodos para medir la actividad promotora se conocen bien en la técnica. Véase en la sección titulada "Evaluación de la actividad promotora" ejemplos de métodos adecuados.

Dichos fragmentos generalmente comprenderán la secuencia de reconocimiento TATA de la secuencia promotora específica. Estos fragmentos pueden obtenerse escindiendo la secuencia nucleotídica promotora de origen natural divulgada en la presente memoria con enzimas de restricción, sintetizando una secuencia nucleotídica de la secuencia de origen natural de la secuencia de ADN promotora, o mediante el uso de la tecnología PCR. Véase, especialmente, Mullis et al. (1987) *Methods Enzymol.* 155:335-350 y Erlich, ed. (1989) *PCR Technology* (Stockton Press, Nueva York). También se abarcan variantes de estos fragmentos promotores, tales como los resultantes de la mutagénesis dirigida al sitio, en las composiciones de la presente invención que comprenden al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 o tienen al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, y las cuales pueden iniciar la transcripción constitutiva en una célula vegetal.

En la presente memoria también se abarcan variantes de las secuencias promotoras divulgadas en la presente memoria. "Variante" significa una secuencia suficientemente idéntica. Las secuencias promotoras abarcadas por la presente invención son suficientemente idénticas a la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 2. Por "suficientemente idéntica" se entiende una secuencia nucleotídica que tiene al 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia utilizando uno de los programas de alineación descritos en la presente memoria.

Las variantes de origen natural pueden identificarse con el uso de técnicas de biología molecular conocidas, tales como las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación descritas más adelante. Las secuencias nucleotídicas variantes también incluyen secuencias nucleotídicas derivadas sintéticamente que han sido generadas, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida al sitio pero que aún tienen actividad promotora tal como se define en la presente memoria.

Las variantes abarcadas en la presente invención son biológicamente activas, es decir, continúan conservando la actividad biológica deseada de la secuencia natural, es decir, conservan la actividad promotora (es decir, iniciación de la transcripción constitutiva). Por "conservar la actividad promotora" se entiende que la variante tendrá al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 70 %, o al menos aproximadamente 80 % o más de la actividad promotora de la secuencia nativa. Los métodos para medir la actividad promotora se conocen en la técnica. Véase en la sección titulada "Evaluación de la actividad promotora" ejemplos de métodos adecuados.

El experto en la materia apreciará también que se pueden introducir cambios por mutación en las secuencias nucleotídicas de la invención sin alterar la capacidad del promotor para impulsar la expresión en una célula vegetal. Por consiguiente, las moléculas de ácido nucleico aisladas variantes pueden crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia nucleotídica correspondiente divulgada en la presente memoria. Las mutaciones pueden introducirse mediante técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Dichas secuencias nucleotídicas variantes también están abarcadas por la presente invención siempre que comprendan al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 o tengan al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, y puedan iniciar la transcripción constitutiva en una célula vegetal.

De modo alternativo, las secuencias nucleotídicas variantes pueden obtenerse introduciendo mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia promotora, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden seleccionarse para determinar su capacidad para impulsar la expresión de una secuencia nucleotídica unida funcionalmente en una célula vegetal.

Por "funcionalmente unida" se entiende una unión funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en la que la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. Generalmente, pero no siempre, unida funcionalmente significa que las secuencias de ácido nucleico que están unidas son contiguas y, cuando es necesario unen dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en el mismo marco de lectura.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para conseguir una comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las descritas más adelante, permitiendo o no huecos. Cuando se calcula el porcentaje de identidad, generalmente se cuentan las coincidencias exactas.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo

de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, modificado en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en el programa BLASTN de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Las búsquedas nucleotídicas de BLAST pueden llevarse a cabo con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias nucleotídicas homologas a los promotores de la invención.

Para obtener alineaciones espaciadas a efectos comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST tal como se describe en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. De modo alternativo, se puede utilizar PSI-Blast para llevar a cabo una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul et al. (1997) *supra*. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTN). Véase, www.ncbi.nlm.nih.gov. Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). ClustalW compara secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de ADN, y por lo tanto, puede proporcionar datos sobre la conservación de la secuencia de la secuencia nucleotídica entera. El algoritmo ClustalW se usa en varios paquetes de software de análisis de ADN comercializados, tales como el módulo ALIGNX del vector NTi Program Suite (Informax, Inc.). Un ejemplo no limitativo de un programa de software útil para el análisis de las alineaciones ClustalW es GeneDoc™. Genedoc™ (Karl Nicholas) permite la evaluación de la similitud e identidad de ADN entre múltiples genes. Otro ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Dicho algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0), que está incluido en el paquete de software de alineación de secuencias GCG (comercializado por Accelrys, Inc., 9865 Scranton Rd., San Diego, California, EE. UU.).

A menos que se indique otra cosa, GAP Versión 10, que utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48(3):443-453, se utilizará para determinar la identidad o similitud de secuencia usando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia nucleotídica utilizando un Peso de GAP de 50 y un Peso de longitud de 3, y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; % de identidad o % de similitud para una secuencia de aminoácidos utilizando un Peso de GAP de 8 y un Peso de longitud de 2, y el programa de puntuación BLOSUM62. También se pueden usar programas equivalentes. Por "programa equivalente" se entiende cualquier programa de comparación de secuencias que, para cualesquiera dos secuencias en cuestión, genera una alineación que tiene coincidencias de residuos de nucleótidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico cuando se compara con la alineación correspondiente generada por GAP Versión 10.

Mediante el uso de métodos tales como PCR, hibridación y similares, pueden identificarse las secuencias correspondientes de otros organismos, particularmente otras plantas, teniendo dichas secuencias una identidad sustancial con las secuencias de la invención. Véase, por ejemplo, Sambrook J., and Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) e Innis, et al. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, NY). Las secuencias identificadas por su identidad con las secuencias promotoras expuestas en la presente memoria están abarcadas por la presente invención.

Se pueden diseñar cebadores oligonucleotídicos para el uso en reacciones de PCR para amplificar las secuencias de ADN correspondientes a partir del ADNc o ADN genómico de una planta de interés. Los métodos para diseñar cebadores de PCR y clones de PCR se conocen en general en la técnica y se divulgan en Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Véase también Innis et al., eds. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Nueva York); Innis and Gelfand, eds. (1995) PCR Strategies (Academic Press, Nueva York); e Innis and Gelfand, eds. (1999) PCR Methods Manual (Academic Press, Nueva York). Los métodos de PCR conocidos incluyen, pero sin limitarse a, métodos donde se utilizan cebadores apareados, cebadores anidados, cebadores específicos simples, cebadores degenerados, cebadores específicos de gen, cebadores específicos de vector y cebadores parcialmente no coincidentes.

En un método de hibridación, toda o parte de una secuencia nucleotídica conocida puede usarse para cribar bibliotecas de ADNc o genómicas. Los métodos para la construcción de dichas bibliotecas de ADNc y genómicas se conocen en general en la técnica y se divulgan en Sambrook and Russell, 2001, *supra*. Las sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómicos, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN u otros oligonucleótidos, y pueden ser marcadas con un grupo detectable tal como ³²P, o cualquier otro marcador detectable, tal como otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Las sondas de hibridación pueden obtenerse marcando oligonucleótidos sintéticos en función de la secuencia promotora conocida divulgada en la presente memoria. Además, se pueden usar cebadores degenerados diseñados en función de los nucleótidos conservados en la secuencia nucleotídica. La sonda generalmente comprende una región de secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 o 400 nucleótidos consecutivos de la secuencia promotora de la invención o un fragmento o variante de esta. La preparación de sondas para hibridación se conoce en general en la técnica y se divulga en Sambrook and Russell, 2001.

Por ejemplo, la secuencia promotora completa divulgada en la presente memoria, o una o más porciones de la misma, pueden usarse como una sonda capaz de hibridar específicamente con secuencias similares a promotores

correspondientes. Para lograr la hibridación específica en una variedad de condiciones, dichas sondas incluyen secuencias que son únicas y tienen al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, o al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. Dichas sondas pueden usarse para amplificar las secuencias promotoras correspondientes de un organismo seleccionado mediante PCR. Esta técnica puede usarse para aislar

secuencias codificantes adicionales de un organismo deseado o como un ensayo diagnóstico para determinar la presencia de secuencias codificantes en un organismo. Las técnicas de hibridación incluyen detección por hibridación de bibliotecas de ADN en placas (ya sea placas o colonias; véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

La hibridación de dichas secuencias puede llevarse a cabo en condiciones rigurosas. Por "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" se entiende condiciones en las que una sonda hibridará con su secuencia diana en un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces con respecto al fondo). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Al controlar la rigurosidad de las condiciones de hibridación y/o de lavado, se pueden identificar las secuencias diana que son 100 % complementarias con la sonda (hibridación homóloga). De modo alternativo, las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para permitir alguna falta de coincidencia en las secuencias de forma que se detecten menores grados de similitud (hibridación heteróloga). Generalmente, una sonda tiene menos de aproximadamente 1.000 nucleótidos de longitud o menos de 500 nucleótidos de longitud.

Generalmente, serán condiciones rigurosas aquellas en las que la concentración salina es de menos de aproximadamente una concentración de ion de Na de 1,5 M, generalmente aproximadamente de 0,01 a 1,0 M de concentración de ion de Na (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas pueden lograrse con la adición de agentes de desestabilización tales como formamida. Ejemplos de condiciones de rigurosidad baja incluyen la hibridación con una solución tampón de 30 a 35 % de formamida, NaCl 1 M, 1 % de SDS (dodecil sulfato sódico) a 37 °C y un lavado en 1X a 2X de SSC (20X de SSC = NaCl 3,0 M/citrato de trisodio 0,3 M) a 50 a 55 °C. Ejemplos de condiciones de rigurosidad moderada incluyen la hibridación en 40 a 45 % de formamida, NaCl 1,0 M, 1 % de SDS a 37 °C y un lavado de 0,5X a 1X de SSC a 55 a 60 °C. Ejemplos de condiciones de rigurosidad alta incluyen hibridación en 50 % de formamida, NaCl 1 M, 1 % de SDS a 37 °C y un lavado en 0,1X de SSC a 60 a 65 °C. Opcionalmente, las soluciones tampón de lavado pueden comprender aproximadamente de 0,1 % a aproximadamente 1 % de SDS. La duración de la hibridación es generalmente menos de aproximadamente 24 horas, habitualmente aproximadamente de 4 a aproximadamente 12 horas. Opcionalmente, las soluciones tampón de lavado pueden comprender aproximadamente de 0,1 % a aproximadamente 1 % de SDS.

La especificidad generalmente está en función de los lavados poshibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para los híbridos ADN-ADN, se puede calcular la T_m a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-28 : $T_m = 81,5\text{ }^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$; donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de los nucleótidos guanosina y citosina en el ADN, % form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (según se ha definido en la fuerza iónica y pH) a la cual 50 % de una secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda perfectamente apareada. La T_m se reduce aproximadamente 1 °C por cada 1 % de no coincidencia; por lo tanto, la T_m , las condiciones de hibridación y/o lavado pueden ajustarse para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con ≥ 90 % de identidad, la T_m puede reducirse 10 °C. Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, condiciones rigurosas severas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3, o 4 °C menos que el punto de fusión térmica (T_m) ; las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9, o 10 °C menos que el punto de fusión térmica (T_m); las condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20 °C menos que el punto de fusión térmica (T_m). Utilizando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado y de T_m deseada, los expertos en la materia comprenderán que las variaciones en la rigurosidad de la hibridación y/o las soluciones de lavado se describen de forma inherente. Si el grado deseado de resultados de no coincidencia en una T_m es menos de 45 °C (solución acuosa) o 32 °C (solución de formamida), se puede aumentar la concentración de SSC para que pueda utilizarse una temperatura más alta. Se proporciona una guía exhaustiva para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, Nueva York); y Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York). Véase Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

También se divulgan las secuencias aisladas que tienen actividad promotora y que hibridan en condiciones rigurosas con secuencias promotoras divulgadas en la presente memoria, o con fragmentos de las mismas.

Métodos de uso

Los métodos de la presente invención se refieren a la expresión de secuencias nucleotídicas heterólogas en plantas y células vegetales bajo el control de la secuencia promotora de la presente invención. Las plantas transgénicas pueden tener un cambio en el fenotipo, incluidos, pero sin limitarse a, un mecanismo de defensa contra patógenos o insectos alterado, una resistencia aumentada a uno o más herbicidas, una capacidad aumentada para resistir a condiciones ambientales estresantes, una capacidad modificada para producir almidón, un nivel modificado de producción de almidón, un contenido y/o composición de aceite modificado, una capacidad modificada para utilizar, descomponer y/o almacenar nitrógeno y similares. Estos resultados pueden lograrse a través de la expresión de genes heterólogos o mediante la expresión aumentada de productos endógenos en las plantas. De modo alternativo, los resultados pueden lograrse reduciendo la expresión de uno o más productos endógenos, específicamente enzimas, transportadores o cofactores, o alterando la absorción de nutrientes en la planta.

En general, la secuencia nucleotídica para el promotor de la invención se proporciona en un casete de expresión con una secuencia nucleotídica de interés, generalmente una secuencia nucleotídica heteróloga, para expresión en la planta de interés. Por "secuencia nucleotídica heteróloga" se entiende una secuencia que no está unida funcionalmente de forma natural con la secuencia promotora, incluidas múltiples copias de origen no natural de una secuencia de ADN de origen natural. Aunque esta secuencia nucleotídica es heteróloga con respecto a la secuencia promotora, puede ser homologa, o nativa, o heteróloga, o extraña para la planta hospedadora. Se reconoce que el promotor también puede impulsar la expresión de su secuencia nucleotídica homologa o nativa. En algunos casos, la planta transformada puede tener un cambio en el fenotipo. Las secuencias de ácido nucleico heterólogas incluyen aquellas que son exógenas, o no están presentes en la célula vegetal sin transformar, así como aquellas que pueden ser endógenas o estar presentes en la célula vegetal sin transformar. "Heterólogas" generalmente se refiere a las secuencias de ácido nucleico que no son endógenas de la célula o parte del genoma nativo en el que están presentes, y han sido añadidas a la célula por infección, transfección, microinyección, electroporación, microproyección o similares.

Cualquier secuencia de interés puede ser expresada por las secuencias promotoras de la invención. Dichas secuencias nucleotídicas heterólogas incluyen, pero sin limitarse a, secuencias codificantes de tolerancia a herbicidas, secuencias codificantes insecticidas, secuencias codificantes nematocidas, secuencias codificantes antimicrobianas, secuencias codificantes antifúngicas, secuencias codificantes antivirales, secuencias codificantes de tolerancia al estrés abiótico y biótico o secuencias que modifican los rasgos de las plantas tales como el rendimiento, calidad de grano, contenido de nutrientes, calidad y cantidad de almidón, fijación y/o utilización de nitrógeno y contenido y/o composición de aceite.

Los genes más específicos de interés para la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, genes que mejoran el rendimiento del cultivo, genes que mejoran la deseabilidad de los cultivos, genes que codifican proteínas que confieren resistencia al estrés abiótico, tal como sequía, temperatura, salinidad, metales tóxicos o elementos traza, o aquellos que confieren resistencia a toxinas tales como pesticidas y herbicidas, o al estrés biótico, tal como ataques de hongos, virus, bacterias, insectos y nematodos, y el desarrollo de enfermedades asociadas con dichos organismos. Se reconoce que cualquier gen de interés puede unirse funcionalmente con las secuencias promotoras de la invención y expresarse en una planta.

Estas secuencias nucleotídicas heterólogas pueden codificar proteínas que están implicadas en proporcionar resistencia a enfermedades o plagas. Por "resistencia a enfermedades" o "resistencia a plagas" se entiende que las plantas evitan los síntomas dañinos que son el resultado de las interacciones planta-patógeno. Los genes de resistencia a enfermedades y de resistencia a insectos tales como lisozimas o cecopinas para protección antibacteriana, o proteínas tales como defensinas, glucanasas o quitinasas para protección antifúngica, o endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*, inhibidores de la proteasa, colagenasas, lectinas o glucosidasas para el control de nematodos o insectos son todos ejemplos de productos génicos útiles. Se pueden encontrar ejemplos de genes de interés, por ejemplo, en www.nbiap.vt.edu/cfdocs/fieldtests2.cfm.

"Plaga" incluye, pero no se limita a, insectos, hongos, bacterias, virus, nematodos, ácaros, garrapatas y similares. Las plagas de insectos incluyen insectos seleccionados de los órdenes *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera*, etc., particularmente *Coleoptera*, *Lepidoptera* y *Diptera*. Los virus incluyen, pero sin limitarse a, virus del mosaico del tabaco o el pepino, virus de las manchas anulares, virus de la necrosis, virus del mosaico del maíz enano, etc. Los nematodos incluyen, pero sin limitarse a, nematodos parásitos tales como los nematodos del nudo de la raíz, los quísticos y de lesiones, incluidos *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp., y *Globodera* spp.; específicamente miembros de los nematodos quísticos, incluidos, pero sin limitarse a, *Heterodera glycines* (nematodo quístico de la soja); *Heterodera schachtii* (nematodo quístico de la remolacha); *Heterodera avenae* (nematodo quístico del cereal); y *Globodera rostochiensis* y *Globodera pailida* (nematodos quísticos de la patata). Los nematodos de lesiones incluyen, pero sin limitarse a, *Pratylenchus* spp. Las plagas fúngicas incluyen aquellas que provocan royas amarillas, ralladas en hoja y en tallos.

Una "proteína de resistencia a herbicidas" o una proteína resultante de la expresión de una "molécula de ácido

nucleico que codifica la resistencia a herbicidas" incluye proteínas que confieren a una célula la capacidad de tolerar una concentración más alta de un herbicida que las células que no expresan la proteína, o de tolerar una concentración determinada de un herbicida durante un período de tiempo más prolongado que las células que no expresan la proteína. Los rasgos de resistencia a herbicidas pueden introducirse en las plantas mediante genes que

5 codifican la resistencia a herbicidas que actúan para inhibir la acción de la acetolactato sintasa (ALS), en particular, los herbicidas del tipo sulfonilurea, genes que codifican la resistencia a herbicidas que actúan para inhibir la acción de la glutamina sintasa, tal como fosfinotricina o basta (por ejemplo, el gen bar) , glifosato (por ejemplo, el gen de la EPSP sintasa y el gen de GAT) u otros genes de este tipo conocidos en la técnica.

10 Los genes que mejoran el rendimiento del cultivo incluyen genes de enanismo, tales como Rht1 y Rht2 (Peng et al. (1999) Nature 400:256-261), y aquellos que aumentan el crecimiento de la planta, tales como el de la glutamato deshidrogenasa inducible por amonio. Los genes que mejoran la deseabilidad de los cultivos incluyen, por ejemplo, aquellos que permiten que las plantas tengan un contenido de grasas saturadas reducido, aquellos que refuerzan el valor nutritivo de las plantas y aquellos que aumentan la proteína de los granos. Los genes que mejoran la tolerancia

15 a la sal son aquellos que aumentan o posibilitan el crecimiento vegetal en un ambiente de salinidad más alto que en el ambiente natural de la planta en la cual se ha introducido el gen(es) de tolerancia a la sal.

Además, se proporcionan métodos para identificar elementos reguladores (por ejemplo, promotores, terminadores y potenciadores). Por "elemento regulador" o "región reguladora" se entiende una porción de ácido nucleico que se

20 encuentra en dirección 5' o en dirección 3' de un gen, que puede consistir en ADN o ARN, o ambos ADN y ARN y que participa en la expresión génica. Los elementos reguladores pueden ser capaces de mediar la especificidad para órganos, o controlar la activación génica del desarrollo o temporal e incluyen elementos promotores, elementos promotores nucleares, elementos que son inducibles en respuesta a un estímulo externo, elementos que se activan constitutivamente, terminadores de la transcripción, señales de poliadenilación y elementos que disminuyen o

25 aumentan la actividad promotora tales como elementos reguladores negativos o potenciadores de la transcripción, respectivamente. Por "que actúa en cis" se entiende una secuencia que está físicamente contigua a la secuencia transcrita. Las secuencias que actúan en cis generalmente interactúan con proteínas u otras moléculas para llevar a cabo (activar o desactivar, regular, moderar, etc.) la transcripción. Por "potenciador de la transcripción" se entiende una secuencia de ácido nucleico que, cuando se posiciona próxima a un promotor y está presente en un medio de

30 transcripción capaz de sustentar la transcripción, confiere una actividad de transcripción aumentada en comparación con la resultante a partir del promotor en ausencia del potenciador. Los potenciadores pueden funcionar en dirección 5', dentro, o en dirección 3' de un gen, incluso hasta a 50 kilobases del sitio de iniciación de la transcripción. Los potenciadores también pueden funcionar independientemente de su orientación. Por "terminador de la transcripción" se entiende una secuencia de ADN que incluye una secuencia de pares de bases de nucleótidos necesaria para

35 reducir o eliminar la transcripción. Por "señal de poliadenilación" se entiende una secuencia que controla la terminación de la transcripción y la traducción.

Las secuencias reguladoras para su uso en plantas pueden clonarse a partir de la soja, diseñando uno o más cebadores de PCR en función de la secuencia de un gen vegetal o elemento regulador. El método puede

40 comprender diseñar al menos un cebador capaz de hibridar con una secuencia nucleotídica de una planta, usar el cebador para amplificar ADN de una planta de soja para crear ADN amplificado y probar el ADN amplificado para determinar su actividad como secuencia reguladora. Por "actividad como secuencia reguladora" se entiende la capacidad para producir la transcripción o traducción de un gen. Incluye la actividad promotora, la actividad de potenciación de la transcripción, la actividad de terminación de la transcripción y la actividad de poliadenilación. Los

45 métodos para medir o probar la actividad promotora se conocen en la técnica (véase la sección titulada "Evaluación de la actividad promotora"). Los métodos para medir o probar la actividad de potenciación se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes US-6.806.064, US-6.818.757 y US-6.784.289). Los métodos para medir o probar la actividad de terminación se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, la patente US-5.093.252). Los métodos para medir o probar la actividad de poliadenilación se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, la patente US-

50 6.632.637).

De modo alternativo, los elementos reguladores pueden identificarse y clonarse mediante otros enfoques. Por ejemplo, se podrían construir bibliotecas genómicas o subgenómicas de soja usando vectores BAC, cosmidicos o

55 lambda. Las bibliotecas podrían hibridarse usando elementos promotores de una planta. De modo alternativo, las bibliotecas podrían hibridarse mediante sonda usando regiones codificantes de genes de una planta. Los clones resultantes se podrían secuenciar y se podrían determinar los elementos que actúan en cis circundantes a las regiones codificantes de la soja. De modo alternativo, se podrían amplificar fragmentos de las regiones codificantes de diversos genes de la soja a partir de ADN genómico mediante PCR utilizando cebadores diseñados a partir de regiones conservadas de genes vegetales, tales como regiones conservadas del maíz. Los fragmentos de la región

60 codificante de la soja podrían utilizarse a continuación para hibridar con las bibliotecas genómicas tal como se ha descrito.

Los elementos que actúan en cis podrían clonarse usando PCR inversa. Las secuencia de las regiones codificantes de genes de la soja podrían obtenerse tal como se ha descrito anteriormente, y a continuación podrían utilizarse los

65 cebadores de PCR diseñados y usar la PCR inversa para clonar el ADN que flanquea las regiones codificantes utilizando técnicas conocidas en la técnica.

Secuencia no codificante

La secuencia nucleotídica heteróloga que está funcionalmente unida al promotor de soja divulgado en la presente memoria puede ser una secuencia nucleotídica no codificante para un gen diana. Por "secuencia nucleotídica no codificante" se entiende una secuencia que está en sentido inverso al sentido normal de 5'-a-3' de dicha secuencia nucleotídica. La expresión de una secuencia de ADN no codificante en una célula vegetal evita la expresión normal del gen diana. La secuencia nucleotídica no codificante codifica un transcrito de ARN que es complementario y capaz de hibridar con el ARN mensajero (ARNm) endógeno producido por la transcripción del gen diana. De este modo, la producción de la proteína nativa codificada por el gen diana se inhibe y se logra una respuesta fenotípica deseada. Se pueden hacer modificaciones en las secuencias no codificantes siempre que las secuencias hibriden e interfieran en la expresión de ARNm correspondiente. Se pueden usar construcciones no codificantes que tengan aproximadamente 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con las secuencias no codificantes correspondientes. Además, se pueden usar porciones de los nucleótidos no codificantes para interrumpir la expresión del gen diana. Generalmente, se pueden usar secuencias de al menos 50 nucleótidos contiguos, 100 nucleótidos contiguos, 200 nucleótidos contiguos o más. Por consiguiente, las secuencias promotoras divulgadas en la presente memoria pueden unirse funcionalmente a secuencias de ADN no codificantes para reducir o inhibir la expresión de una proteína nativa en la planta.

Casetes de expresión y vectores de transformación en plantas

La transformación de células vegetales puede lograrse mediante una de las diversas técnicas conocidas en la técnica. Por "planta" se entiende plantas enteras, órganos vegetales (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales, propágulos, embriones y progenie de las mismas. Las células vegetales pueden estar diferenciadas o no diferenciadas (por ejemplo, callos, células de cultivo en suspensión, protoplastos, células de hojas, células de raíces, células de floemas, polen). "Plantas transgénicas" o "plantas transformadas" o plantas o células o tejidos "transformados de forma estable" se refieren a plantas que tienen incorporadas o integradas secuencias de ácido nucleico o fragmentos de ADN exógenos en la célula vegetal. Por "transformación estable" se entiende que la construcción nucleotídica introducida en una planta se integra en el genoma de la planta y es capaz de ser heredada por la progenie de la misma.

La secuencia promotora de la invención puede proporcionarse en un casete de expresión que permite que este impulse la expresión de una secuencia heteróloga de interés en células vegetales. Por "casete de expresión" se entiende una construcción de ADN que es capaz de dar como resultado la expresión de una proteína a partir de un marco de lectura abierto en una célula. El casete incluirá en la dirección 5'-3' de la transcripción, una región de iniciación de la transcripción que comprende una de las secuencias nucleotídicas promotoras divulgadas en la presente memoria, o variantes o fragmentos de las mismas, unida funcionalmente a una secuencia heteróloga de interés, y una región de terminación de la traducción y la transcripción (es decir, región de terminación) funcional en plantas. El casete puede contener adicionalmente al menos un gen adicional para ser cotransformado en el organismo, tal como un gen marcador seleccionable. De modo alternativo, el gen o genes adicionales puede proporcionarse en múltiples casetes de expresión. Dicho casete de expresión se proporciona con una pluralidad de sitios de restricción para la inserción de la secuencia heteróloga de interés para que esté bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras.

A menudo, dichas construcciones también contendrán regiones no traducidas en 5' y 3'. Dichas construcciones también pueden contener una "secuencia señal" o "secuencia líder" traducida para facilitar el transporte cotranslacional o postranslacional del péptido de interés hacia ciertas estructuras intracelulares tales como el cloroplasto (u otro plástido), retículo endoplasmático o aparato de Golgi, o para que sea secretado. Por ejemplo, el gen puede manipularse genéticamente para que contenga un péptido señal para facilitar la transferencia del péptido hacia el retículo endoplasmático. También puede ser preferible manipular genéticamente el casete de expresión vegetal para que contenga un intrón, de forma que el procesamiento del ARNm del intrón sea necesario para la expresión. Por "secuencia señal" se entiende una secuencia que se sabe o se sospecha que tiene como resultado el transporte cotranslacional o postranslacional del péptido a través de la membrana celular. En eucariotas, esto generalmente implica la secreción en el aparato de Golgi, con alguna glucosilación resultante. Por "secuencia líder" se entiende cualquiera secuencia que cuando se traduce, da como resultado una secuencia de aminoácidos suficiente para desencadenar el transporte cotranslacional de la cadena peptídica hacia un organelo subcelular. Por consiguiente, esta incluye secuencias líder que se dirigen al transporte y/o glucosilación por pasaje hacia el retículo endoplasmático, pasaje hacia las vacuolas, plástidos, incluidos cloroplastos, mitocondrias y similares.

Por "región no traducida en 3'" se entiende una secuencia nucleotídica situada en dirección 3' con respecto a una secuencia codificante. Las secuencias señal de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar a la adición de ácido poliadenílico en el extremo 3' del precursor del ARNm son regiones no traducidas en 3'. Por "región no traducida en 5'" se entiende una secuencia nucleotídica situada en dirección 5' con respecto a una secuencia codificante. Otros elementos no traducidos en dirección 5' o 3' incluyen potenciadores. Los potenciadores son secuencias nucleotídicas que actúan aumentando la expresión de una región promotora. Los potenciadores se conocen en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a, la región potenciadora SV40 y el elemento potenciador 35S.

La región de terminación puede ser nativa, comprendiendo la región de iniciación transcripcional la secuencia nucleotídica promotora de la presente invención, puede ser nativa con la secuencia de ADN de interés, o puede derivar de otra fuente. Las regiones de terminación convenientes están disponibles a partir del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tales como las regiones de terminación de la octopina sintasa y la nopalina sintasa. Véase también Guerineau et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262:141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) Genes Dev. 5:141-149; Mogen et al. (1990) Plant Cell 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) Gene 91:151-158; Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903; y Joshi et al. (1987) Nucleic Acid Res. 15:9627-9639.

Si procede, el gen o genes de interés puede optimizarse para una expresión aumentada en la célula hospedadora transformada. Es decir, los genes pueden sintetizarse usando codones preferidos para la célula hospedadora para una expresión mejorada, o pueden sintetizarse usando codones a una frecuencia de uso de codones preferida para la célula hospedadora. Generalmente, el contenido de GC del gen aumentará. Véase, por ejemplo, en Campbell y Gowri (1990) Plant Physiol. 92:1-11 una descripción del uso de codones preferido para el hospedador. Los métodos para sintetizar genes preferidos para plantas se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes US-6.320.100; US-6.075.185; US-5.380.831; y US-5.436.391, las Solicitudes publicadas de los Estados Unidos números 20040005600 y 20010003849, y Murray et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498.

En una realización, los ácidos nucleicos de interés se dirigen al cloroplasto para expresión. De este modo, cuando el ácido nucleico de interés no está directamente insertado en el cloroplasto, el casete de expresión contendrá adicionalmente un ácido nucleico que codifica una secuencia señal o peptídica de tránsito para dirigir el producto génico de interés hacia los cloroplastos. Dichos péptidos de tránsito se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Von Heijne et al. (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9:104-126; Clark et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84:965-968; Romer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:1414-1421; y Shah et al. (1986) Science 233:478-481.

Los ácidos nucleicos de interés para dirigirse a los cloroplastos pueden optimizarse para la expresión en el cloroplasto para compensar las diferencias en el uso de codones entre el núcleo vegetal y este organelo. De este modo, los ácidos nucleicos de interés pueden sintetizarse usando codones preferidos para cloroplastos. Véase, por ejemplo, la patente US-5.380.831.

Generalmente, este "casete de expresión vegetal" se insertará en un "vector de transformación vegetal". Por "vector de transformación" se entiende una molécula de ADN que es necesaria para la transformación eficaz de una célula. Dicha molécula puede consistir en uno o más casetes de expresión, y puede organizarse en más de una molécula de ADN "vector". Por ejemplo, los vectores binarios son vectores de transformación vegetales que utilizan dos vectores de ADN no contiguos para codificar todas las funciones que actúan en cis y trans necesarias para la transformación de células vegetales (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). "Vector" se refiere a una construcción de ácido nucleico diseñada para la transferencia entre diferentes células hospedadoras. "Vector de expresión" se refiere a un vector que tiene la capacidad de incorporar, integrar y expresar secuencias o fragmentos de ADN heterólogo en una célula extraña. Por "introducir" se entiende presentar al organismo que se va a transformar, la construcción nucleotídica de tal forma que la construcción consiga el acceso al interior de al menos una célula del organismo.

Este vector de transformación vegetal puede comprender uno o más vectores de ADN necesarios para lograr la transformación de la planta. Por ejemplo, es una práctica común en la técnica utilizar vectores de transformación vegetal que comprenden más de un segmento de ADN contiguo. Estos vectores con frecuencia se denominan en la técnica "vectores binarios". Los vectores binarios, así como los vectores con plásmidos auxiliares a menudo se usan para la transformación mediada por *Agrobacterium*, donde el tamaño y la complejidad de los segmentos de ADN necesarios para lograr la transformación eficaz es bastante grande, y es ventajoso separar las funciones en moléculas de ADN separadas. Los vectores binarios generalmente contienen un vector plasmídico que contiene las secuencias que actúan en cis necesarias para la transferencia del T-ADN (tal como borde izquierdo y borde derecho), un marcador seleccionable que se manipula genéticamente para poder expresarse en una célula vegetal, y un "gen de interés" (un gen manipulado genéticamente para poder expresarse en una célula vegetal de la cual se desea la generación de plantas transgénicas). También están presentes en este vector plasmídico las secuencias necesarias para la replicación bacteriana.

Las secuencias que actúan en cis se disponen de una forma que posibilita la transferencia eficaz a las células vegetales y la expresión en las mismas. Por ejemplo, el gen marcador seleccionable y el gen de interés se sitúan entre los bordes izquierdo y derecho. Con frecuencia, un segundo vector plasmídico contiene los factores que actúan en trans que median la transferencia del T-ADN de *Agrobacterium* a las células vegetales. Este plásmido a menudo contiene las funciones de virulencia (genes Vir) que posibilitan la infección de células vegetales por *Agrobacterium*, y la transferencia del ADN mediante escisión en las secuencias de borde y la transferencia del ADN mediada por vir, tal como se entiende en la técnica (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science, 5:446-451). Se pueden usar varios tipos de cepas de *Agrobacterium* (por ejemplo, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.) para la transformación vegetal. El segundo vector plasmídico no es necesario para transformar plantas mediante otros métodos tales como microproyección, microinyección, electroporación, polietilenglicol, etc.

Transformación de plantas

Los métodos de la invención implican introducir una construcción nucleotídica en una planta. Por "introducir" se entiende presentar a la planta, la construcción nucleotídica de tal forma que la construcción puede acceder al interior de al menos una célula de la planta. Los métodos de la invención no requieren que se use un método específico para introducir una construcción nucleotídica en una planta, solo que la construcción nucleotídica pueda acceder al interior de al menos una célula de la planta. Los métodos para introducir construcciones nucleotídicas en plantas se conocen en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a, métodos de transformación estable, métodos de transformación transitoria y métodos mediados por virus.

Por "planta" se entiende plantas enteras, órganos vegetales (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales, propágulos, embriones y progenie de las mismas. Las células vegetales pueden estar diferenciadas o no diferenciadas (por ejemplo, callos, células de cultivo en suspensión, protoplastos, células de hojas, células de raíces, células de floemas, polen).

"Plantas transgénicas" o "plantas transformadas" o plantas o células o tejidos "transformados de forma estable" se refieren a plantas que tienen incorporadas o integradas secuencias de ácido nucleico o fragmentos de ADN exógenos en la célula vegetal. Estas secuencias de ácido nucleico heterólogas incluyen aquellas que son exógenas, o no están presentes en la célula vegetal sin transformar, así como aquellas que pueden ser endógenas o estar presentes en la célula vegetal sin transformar. "Heterólogas" generalmente se refiere a las secuencias de ácido nucleico que no son endógenas de la célula o parte del genoma natural en el que están presentes, y han sido añadidas a la célula por infección, transfección, microinyección, electroporación, microproyección o similares.

Las plantas transgénicas de la invención expresan una o más de las secuencias de toxina nuevas divulgadas en la presente memoria. En varias realizaciones, la planta transgénica comprende además uno o más genes adicionales para la resistencia a insectos (por ejemplo, Cry1, tales como miembros de las familias Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E y Cry1F; Cry2, tales como miembros de la familia Cry2A; Cry9, tales como miembros de las familias Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E y Cry9F; etc.). El experto en la materia entenderá que la planta transgénica puede comprender cualquier gen que imparta un rasgo agronómico de interés. En varias realizaciones, el promotor de la invención puede usarse para impulsar la expresión de uno o más genes descritos en las publicaciones de patentes indicadas en la Tabla 1, cuyos contenidos se incorporan a la presente por referencia en su totalidad.

Tabla 1

Rasgo	Referencia
Eficacia de uso del agua	WO 2000/073475
	WO2009/150541
	WO2009/150541
	WO2012075429
	WO2012077020
Eficiencia del uso del nitrógeno	WO 1995/009911
	WO 1997/030163
	WO 2007/092704
	WO 2007/076115
	WO 2005/103270
	WO 2002/002776
	WO2008/051608
	WO2008/112613
	WO2009/015096
	WO2009/061776
	WO2009/105492
	WO2009/105612
	WO2009/117853
	WO2010/006010
	WO2009/117853
	WO2009/061776
	WO2009/015096

Rasgo	Referencia
	WO2009/105492
	WO2009/105612
	WO 2010/053621
	WO 2010/053867
	WO2010/077890
	WO 2010/086220
	WO 2010/111568
	WO 2010/140388
	WO2010/007496
	WO2011/022597
	WO2011/022608
	WO2012087140
Fotosíntesis mejorada	WO 2008/056915
	WO 2004/101751
Resistencia a nematodos	WO 1995/020669
	WO 2001/051627
	WO 2008/139334
	WO 2008/095972
	WO 2006/085966
	WO 2003/033651
	WO 1999/060141
	WO 1998/012335
	WO 1996/030517
	WO 1993/018170
	WO2008/095886
	WO2008/095887
	WO2008/095888
	WO2008/095889
	WO2008/095910
	WO2008/095911
	WO2008/095916
	WO2008/095919
	WO2008/095969
	WO2008/095970
	WO2008/095972
	WO2008/110522
	WO2008/139334
	WO2008/152008
	WO2010/077858
	WO 2010/091230
	WO 2010/102172
	WO 2010/106163
	WO2011/082217
	WO2011/003783
Dehiscencia de vaina reducida	WO 2006/009649

Rasgo	Referencia
	WO 2004/113542
	WO 1999/015680
	WO 1999/000502
	WO 1997/013865
	WO 1996/030529
	WO 1994/023043
Resistencia a áfidos	WO 2006/125065
	WO 1997/046080
	WO 2008/067043
	WO 2004/072109
	WO2009/091860
	WO2010036764
Resistencia a Sclerotinia	WO 2006/135717
	WO 2006/055851
	WO 2005/090578
	WO 2005/000007
	WO 2002/099385
	WO 2002/061043
Resistencia a Botrytis	WO 2006/046861
	WO 2002/085105
Resistencia a Bremia	US 20070022496
	WO 2000/063432
	WO 2004/049786
	WO2009/111627
	WO2009/111627
Resistencia a Erwinia	WO 2004/049786
Resistencia a Closteovirus	WO 2007/073167
	WO 2007/053015
	WO 2002/022836
Tolerancia al estrés (incluida tolerancia a la sequía)	WO 2010/019838
	WO 2009/049110
	WO2008/002480
	WO2005/033318
	WO2008/002480
	WO2008/005210
	WO2008/006033
	WO2008/008779
	WO2008/022486
	WO2008/025097
	WO2008/027534
	WO2008/027540
	WO2008/037902
	WO2008/046069
	WO2008/053487
	WO2008/057642

Rasgo	Referencia
	WO2008/061240
	WO2008/064222
	WO2008/064341
	WO2008/073617
	WO2008/074025
	WO2008/076844
	WO2008/096138
	WO2008/110848
	WO2008/116829
	WO2008/117537
	WO2008/121320
	WO2008/125245
	WO2008/142034
	WO2008/142036
	WO2008/150165
	WO2008/092935
	WO2008/145675
	WO2009/010460
	WO2009/016240
	WO2009/031664
	WO2009/038581
	WO2009/049110
	WO2009/053511
	WO2009/054735
	WO2009/067580
	WO2009/073605
	WO2009/077611
	WO2009/079508
	WO2009/079529
	WO2009/083958
	WO2009/086229
	WO2009/092009
	WO2009/094401
	WO2009/094527
	WO2009/102965
	WO2009/114733
	WO2009/117448
	WO2009/126359
	WO2009/126462
	WO2009/129162
	WO2009/132057
	WO2009/141824
	WO2009/148330
	WO 2010/055024
	WO 2010/058428

Rasgo	Referencia
	WO 2010/064934
	WO2010/076756
	WO 2010/083178
	WO 2010/086221
	WO 2010/086277
	WO 2010/101818
	WO 2010/104848
	WO 2010/118338
	WO 2010/120017
	WO 2010/120054
	WO 2010/121316
	WO 2010/127579
	WO 2010/134654
	WO 2010/139993
	WO2010/039750
	WO2011/034968
	WO2011/001286
	WO2011/017492
	WO2011/018662
	WO2011/024065
	WO2011/038389
	WO2011/46772
	WO2011/053897
	WO2011/052169
	WO2011/063706
	WO2011/067745
	WO2011/079277
	WO2011/080674
	WO2011/083290
	WO2011/083298
	WO2011/091764
	WO2011/052169
	WO2011/053897
	WO2011/056769
	WO2011/063706
	WO2011/067745
	WO2011/083290
	WO2011/083298
	WO2011/091764
	WO2011/096609
	WO2011/122761
Resistencia a tobamovirus	WO 2006/038794
	WO2009086850
Rendimiento	WO 2010/046221
	WO 2010/046471

Rasgo	Referencia
	WO 2010/049897
	WO 2010/055837
	WO 2010/065867
	WO2010/069847
	WO2010/075143
	WO2010/075243
	WO 2010/100595
	WO 2010/102220
	WO 2010/104092
	WO 2010/108836
	WO 2010/120862
	WO 2010/123667
	WO 2010/124953
	WO 2010/125036
	WO 2010/127969
	WO 2010/129501
	WO 2010/140388
	WO 2010/140672
	WO2011/011273
	WO2011/000466
	WO2011/003800
	WO2011/006717
	WO2011/008510
	WO2011/009801
	WO2011/011412
	WO2011/015985
	WO2011/020746
	WO2011/021190
	WO2011/025514
	WO2011/025515
	WO2011/025516
	WO2011/025840
	WO2011/031680
	WO2011/036160
	WO2011/036232
	WO2011/041796
	WO2011/044254
	WO2011/048009
	WO2011/053898
	WO2011/051120
	WO2011/058029
	WO2011/061656
	WO2011/085062
	WO2011/088065
	WO2011/053898

Rasgo	Referencia
	WO2011/058029
	WO2011/061656
	WO2011/085062
	WO2011/088065
	WO2011/095958
	WO2011/097215
	WO2011/099006
	WO2011/104128
	WO2011/104141
	WO2011/104143
	WO2011/104155
	WO2011/106734
	WO2011/106794
	WO2011/109661
	WO2011/114279
	WO2011/114305
	WO2011/114312
	WO2011/114313
	WO2011/117800
	WO2011/135527
	WO2011/136909
	WO2011/139431
	WO2011/140329
	WO2011/146754
	WO2011/147826
	WO2011/157976
	WO2011/161617
	WO2011/161620
	WO2011/109618
	WO2011/159452
	WO2012078949
	WO2012083219
	WO2012084742
	WO2012084756
	WO2012087903
	WO2012087940
	WO2012090500
	WO2012091939
	WO2012092106
	WO2012092327
	WO2012092573
	WO2012092580
	WO2012092596
	WO2012093032
	WO2012093833

Rasgo	Referencia
	WO2012097720
	WO2012098517
	WO2012102999
	WO2012106321
Contenido/composición de aceite	WO 2010/045324
	WO 2010/053541
	WO 2010/130725
	WO 2010/140682
	WO2011/006948
	WO2011/049627
	WO2011/060946
	WO2011/062748
	WO2011/064181
	WO2011/064183
	WO2011/075716
	WO2011/079005
	WO2011/049627
	WO2011/062748
	WO2011/064181
	WO2011/064183
	WO2011/079005
	WO2011/146524
	WO2011/161093
	WO2011/163557
	WO2011/163632
	WO2011/163632
	WO2012074385
	WO2012074386
	WO2012103452
Producción biofarmacéutica	WO 2010/121818
	WO2011/119115
Recombinación mejorada	WO2010/071418
	WO 2010/133616
Aspecto de la planta	WO 2010/069004
	WO2011/060552
Control de enfermedades (otras)	WO 2010/059558
	WO2010/075352
	WO2010/075498
	WO 2010/085289
	WO 2010/085295
	WO 2010/085373
	WO2009/000736
	WO2009/065863
	WO2009/112505
	WO 2010/089374

Rasgo	Referencia
	WO 2010/120452
	WO 2010/123904
	WO 2010/135782
	WO2011/025860
	WO2011/041256
	WO2011/031006
	WO2011/031922
	WO2011/075584
	WO2011/075585
	WO2011/075586
	WO2011/075587
	WO2011/075588
	WO2011/084622
	WO2011/084626
	WO2011/084627
	WO2011/084629
	WO2011/084630
	WO2011/084631
	WO2011/084314
	WO2011/084324
	WO2011/023571
	WO2011/040880
	WO2011/082304
	WO2011/003783
	WO2011/020797
	WO2011/069953
	WO2011/075584
	WO2011/075585
	WO2011/075586
	WO2011/075587
	WO2011/075588
	WO2011/084314
	WO2011/084324
	WO2011/084622
	WO2011/084626
	WO2011/084627
	WO2011/084629
	WO2011/084630
	WO2011/084631
	WO2011/133892
	WO2011/133895
	WO2011/133896
	WO2011/082217
	WO2011/104153
	WO2011/082304

Rasgo	Referencia
	WO2011/100650
	WO2011/158242
	WO2012003207
	WO2012004013
	WO2012004401
	WO2012006271
	WO2012006426
	WO2012006439
	WO2012006443
	WO2012006622
	WO2012007916
	WO2012007919
	WO2012009551
	WO2012011034
	WO2012012403
	WO2012015039
	WO2012058266
	WO2012058458
	WO2012058528
	WO2012058730
	WO2012061513
	WO2012063200
	WO2012065166
	WO2012065219
	WO2012066008
	WO2012067127
	WO2012068966
	WO2012071039
	WO2012071040
Tolerancia a los herbicidas	US 4761373
	US 5304732
	US 5331107
	US 5718079
	US 6211438
	US 6211439
	US 6222100
	US 2003/0217381
	US 2003/0217381
	WO2004/106529
	WO2000/27182
	WO2005/20673
	WO 2001/85970
	US 5545822
	US 5736629
	US 5773703

Rasgo	Referencia
	US 5773704
	US 5952553
	US 6274796
	WO 2004/106529
	WO2004/16073
	WO 2003/14357
	WO 2003/13225
	WO 2003/14356
	US 5188642
	US 4940835
	US 5633435
	US 5804425
	US 5627061
	US 5646024
	US 5561236
	US 6333449
	US 6933111
	US 6468747
	US 6376754
	US 7105724
	US 7105724
	WO 2008/051633
	US 7105724
	US 5670454
	US 7105724
	US 7105724
	US 7105724
	US 7105724
	US 5670454
	US 7105724
	US 7105724
	US 7105724
	US 5670454
	US 7105724
	US 7105724
	US 7105724
	US 7105724
	US 7105724
	US 6153401
	US 6100446
	WO 2005/107437
	US 5670454
	US 5608147
	US 5670454
	WO 2004/055191
	WO 199638567

Rasgo	Referencia
	US 6791014
	US 2002/0073443
	US 20080052798
	WO2011/022470
	WO2011/034936
	WO2011/028832
	WO2011/028833
	WO2011/028836
	WO2011/068567
	WO2011/076345
	WO2011/085221
	WO2011/094199
	WO2011/094205
	WO2011/068567
	WO2011/085221
	WO2011/094199
	WO2011/094205
	WO2011/145015
	WO2012047595
	WO2012048124
	WO2012048136
	WO2012048807
	WO2012049663
	WO2012050962
	WO2012056401
	WO2012057466
	WO2012057465
	WO2012058223
Metabolismo de la planta	WO2011/060920
	WO2011/119115
	WO2011/102394
Reproducción	WO2011/113839
Biocombustibles	WO2012073493
Maduración de frutas	WO2012073494
Calidad de la fibra	WO2012074386

La transformación de células vegetales puede lograrse mediante una de las diversas técnicas conocidas en la técnica. El gen pesticida de la invención puede modificarse para obtener o potenciar la expresión en células vegetales. Generalmente, una construcción que expresa dicha proteína contendría un promotor para impulsar la transcripción del gen, así como una región no traducida en 3' para permitir la terminación de la transcripción y la poliadenilación. La organización de dichas construcciones se conoce en la técnica. En algunos casos, puede ser útil manipular genéticamente el gen con el fin de que el péptido resultante se secrete, o se dirija de otra forma dentro de la célula vegetal. Por ejemplo, el gen puede manipularse genéticamente para que contenga un péptido señal para facilitar la transferencia del péptido hacia el retículo endoplasmático. También puede ser preferible manipular genéticamente el casete de expresión vegetal para que contenga un intrón, de forma que el procesamiento del ARNm del intrón sea necesario para la expresión.

Generalmente, este "casete de expresión vegetal" se insertará en un "vector de transformación vegetal". Este vector de transformación vegetal puede comprender uno o más vectores de ADN necesarios para lograr la transformación

vegetal. Por ejemplo, es una práctica común en la técnica utilizar vectores de transformación vegetal que comprenden más de un segmento de ADN contiguo. Estos vectores frecuentemente se denominan en la técnica “vectores binarios”. Los vectores binarios así como vectores con plásmidos auxiliares a menudo se usan para la transformación mediada por *Agrobacterium*, donde el tamaño y la complejidad de los segmentos de ADN necesarios para lograr la transformación eficaz es bastante grande, y es ventajoso separar las funciones en moléculas de ADN separadas. Los vectores binarios generalmente contienen un vector plasmídico que contiene las secuencias que actúan en cis necesarias para la transferencia del T-ADN (tal como borde izquierdo y borde derecho), un marcador seleccionable que se manipula genéticamente para poder expresarse en una célula vegetal, y un “gen de interés” (un gen manipulado genéticamente para poder expresarse en una célula vegetal de la cual se desea la generación de plantas transgénicas). También están presentes en este vector plasmídico las secuencias necesarias para la replicación bacteriana. Las secuencias que actúan en cis se disponen de una forma que posibilita la transferencia eficaz hacia células vegetales y la expresión en las mismas. Por ejemplo, el gen marcador seleccionable y el gen pesticida se sitúan entre los bordes izquierdo y derecho. Frecuentemente, un segundo vector plasmídico contiene los factores que actúan en trans que median la transferencia del T-ADN de *Agrobacterium* a las células vegetales. Este plásmido frecuentemente contiene las funciones de virulencia (genes Vir) que posibilitan la infección de células vegetales por *Agrobacterium*, y la transferencia del ADN mediante escisión en las secuencias de borde y la transferencia del ADN mediada por vir, tal como se entiende en la técnica (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science, 5:446-451). Se pueden usar varios tipos de cepas de *Agrobacterium* (por ejemplo, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.) para la transformación vegetal. El segundo vector plasmídico no es necesario para transformar plantas mediante otros métodos tales como microproyección, microinyección, electroporación, polietilenglicol, etc.

En general, los métodos de transformación vegetal implican transferir ADN heterólogo a células vegetales diana (por ejemplo, embriones inmaduros o maduros, cultivos en suspensión, callos no diferenciados, protoplastos, etc.), seguido de la aplicación de un nivel umbral máximo de selección adecuada (en función del gen marcador seleccionable) para recuperar las células vegetales transformadas de un grupo de masa celular sin transformar. Los explantes generalmente se transfieren a un suministro fresco del mismo medio y se cultivan de forma rutinaria. Posteriormente, las células transformadas se diferencian en brotes después de colocarlas en medio de regeneración complementado con un nivel umbral máximo de agente de selección. A continuación, los brotes se transfieren a un medio de enraizado selectivo para recuperar el brote o plántula enraizado. Las plántulas transgénicas a continuación crecen hasta convertirse en plantas maduras y producen semillas fértiles (por ejemplo, Hiei et al. (1994) The Plant Journal 6:271-282; Ishida et al. (1996) Nature Biotechnology 14:745-750). Los explantes generalmente se transfieren a un suministro fresco del mismo medio y se cultivan de forma rutinaria. Una descripción general de las técnicas y métodos para generar plantas transgénicas se encuentra en Ayres and Park (1994) Critical Reviews in Plant Science 13:219-239 y Bommineni and Jauhar (1997) Maydica 42:107-120. Dado que el material transformado contiene muchas células; las células transformadas y no transformadas están presentes en cualquier porción de callo o tejido o grupo de células diana. La capacidad para destruir células no transformadas y permitir que las células transformadas proliferen da lugar a cultivos vegetales transformados. A menudo, la capacidad para extraer células no transformadas es una limitación para la recuperación rápida de células vegetales transformadas y para la generación con éxito de plantas transgénicas.

Los protocolos de transformación, así como los protocolos para introducir secuencias nucleotídicas en plantas pueden variar en función del tipo de planta o célula vegetal, es decir, monocotiledóneas o dicotiledóneas, a las que se dirige la transformación. La generación de plantas transgénicas puede llevarse a cabo mediante varios métodos, incluidos, pero sin limitarse a, microinyección, electroporación, transferencia génica directa, introducción de ADN heterólogo mediante *Agrobacterium* en células vegetales (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de células vegetales con ADN extraño heterólogo adherido a partículas, aceleración de partículas por biolística, transformación por haz de aerosol (solicitud publicada de los Estados Unidos N.º 20010026941; Patente US-4.945.050; Publicación internacional N.º WO 91/00915; Solicitud publicada de los Estados Unidos N.º 2002015066), transformación por Lecl y diversos métodos no mediados por partículas directas para transferir ADN.

Los métodos para la transformación de cloroplastos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917; Svab and Maliga (1993) EMBO J. 12:601-606. El método se basa en la administración con pistola de partículas de ADN que contiene un marcador seleccionable y dirigir el ADN al genoma plastídico a través de recombinación homóloga. Adicionalmente, la transformación plastídica puede lograrse mediante transactivación de una transgén silencioso en el plásmido mediante expresión en tejido preferido de una ARN polimerasa de codificación nuclear y dirigida al plásmido. Dicho sistema ha sido descrito en McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305.

Tras la integración del ADN extraño heterólogo en las células vegetales, se aplica entonces un nivel umbral máximo de selección apropiada en el medio para destruir las células no transformadas y separar y proliferar las células supuestamente transformadas que sobreviven a este tratamiento de selección transfiriéndolas regularmente a un medio nuevo. Mediante el pasaje y estimulación constante con la selección adecuada, se identifican y proliferan las células que se transforman con el vector plasmídico. Se pueden usar métodos moleculares y bioquímicos para confirmar la presencia del gen heterólogo integrado de interés en el genoma de la planta transgénica.

Las células que han sido transformadas pueden cultivarse hasta convertirse en plantas usando medios convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84. A continuación, estas plantas pueden cultivarse y polinizarse con la misma cepa transformada o cepas diferentes y se puede identificar el híbrido resultante que presenta expresión constitutiva de las características fenotípicas deseadas. Se pueden cultivar dos o más generaciones para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene y hereda de forma estable y luego cosechar las semillas para asegurar que se ha logrado la expresión de la característica fenotípica deseada. De esta forma, la presente invención proporciona semillas transformadas (también denominadas "semillas transgénicas") que tienen una construcción nucleotídica de la invención, por ejemplo, un casete de expresión de la invención, incorporado establemente en su genoma.

Plantas

La presente invención puede usarse para la transformación de cualquier especie vegetal, incluidas, pero sin limitarse a, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los ejemplos de plantas de interés incluyen, pero sin limitarse a, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimiento, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza, *Brassica* sp., alfalfa, centeno, mijo, cártamo, cacahuets, batata, yuca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, cajú, macadamia, almendra, avena, verduras, plantas ornamentales y coníferas.

Las verduras incluyen, pero sin limitarse a, tomate, lechuga, judías verdes, judía de lima, guisantes y miembros del género *Curcumis* tales como pepino, melón y melón amarillo. Las plantas ornamentales incluyen, pero sin limitarse a, azalea, hortensia, hibisco, rosa, tulipán, narciso, petunia, clavel, poinsettia y crisantemo. Preferiblemente, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimiento, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, avena, colza, etc.).

La invención es especialmente adecuada para cualquier miembro de la familia de plantas monocotiledóneas incluidas, pero sin limitarse a, maíz, arroz, cebada, avena, trigo, sorgo, centeno, caña de azúcar, piña, cebolla, plátano, coco y dátiles.

Evaluación de la transformación de plantas

Tras la introducción del ADN extraño heterólogo en las células vegetales, la transformación o integración del ADN heterólogo en el genoma de la planta se confirma mediante diversos métodos tales como análisis de ácidos nucleicos y proteínas y metabolitos asociados con el ADN integrado.

El análisis de PCR es un método rápido para detectar las células, tejidos o brotes transformados para determinar la presencia del ADN incorporado en la etapa inicial antes del trasplante en el suelo (Sambrook and Russell, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). La PCR se lleva a cabo usando cebadores oligonucleotídicos específicos para el gen de interés o un fondo de vector de *Agrobacterium*, etc.

La transformación de plantas puede confirmarse mediante análisis de transferencia Southern del ADN genómico (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). En general, el ADN total se extrae del transformante, se digiere con enzimas de restricción adecuadas, se fracciona en un gel de agarosa y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa o nailon. La membrana o "transferencia" se hibrida, por ejemplo, con un fragmento de ADN diana radiomarcado con ³²P para confirmar la integración del ADN introducido en el genoma de la planta de acuerdo con técnicas convencionales (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

En el análisis de transferencia Northern, se aísla ARN de tejidos específicos del transformante, se fracciona en un gel de agarosa formaldehído, se transfiere a un filtro de nailon de acuerdo con procedimientos convencionales que se usan habitualmente en la técnica (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). La expresión del ARN codificado por un gen heterólogo unido funcionalmente al promotor TripPro5 a continuación se prueba hibridando el filtro con una sonda radiactiva derivada del gen heterólogo mediante métodos conocidos en la técnica (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

Evaluación de la actividad promotora

Existen varios métodos para evaluar la actividad promotora en plantas. La función promotora durante la expresión de un gen de interés bajo su control regulador puede evaluarse en la etapa transcripcional o translacional. En la etapa transcripcional, se pueden probar los niveles de ARN mediante ensayos de hibridación ADN-ARN (es decir, análisis de transferencia Northern), PCR de transcriptasa inversa competitiva y ensayos de protección de ARNasa. En la etapa translacional, la actividad promotora puede determinarse usando ensayos funcionales específicos para la proteína sintetizada (por ejemplo, mediante actividad enzimática o por inmunoensayo de la proteína). Por ejemplo, la actividad génica iniciadora, tal como la actividad β -glucuronidasa, la actividad luciferasa o fluorescencia de GFP puede controlarse en varios puntos temporales después de la transformación. La actividad génica indicadora puede controlarse por actividad enzimática, por tinción de células o tejidos con sustrato para la enzima codificada por el

gen indicador o por visualización directa bajo una longitud de onda de luz adecuada (véase, por ejemplo, Wang et al. (2000) Plant Science 156:201-211). La transferencia Western puede llevarse a cabo en las plantas transgénicas para confirmar la presencia de proteína codificada por un gen de interés unido funcionalmente al promotor TripPro5 mediante procedimientos convencionales (Sambrook and Russell, 2001, *supra*) utilizando anticuerpos que se unen a uno o más epítomos presentes en la proteína. Las secuencias promotoras de longitud completa y las delecciones y mutaciones de la secuencia promotora pueden evaluarse y pueden comprarse sus niveles de expresión. Véase, por ejemplo, la patente US-6.072.050; y Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1. Identificación de promotores constitutivos de la soja

Se usaron bases de datos públicas de transcriptoma de soja para identificar genes que se expresan en altos niveles en diferentes tejidos (hojas, vainas, flores, raíces, etc.). Las regiones promotoras (en dirección 5' del primer ATG) de estos genes se amplificaron mediante PCR a partir de ADN genómico de la soja (Jack) y se enlazaron con la región codificante del gen de la luciferasa y un terminador PinII. Estos vectores que contienen promotores se transformaron en *Agrobacterium*. El *Agrobacterium* transformado se usó para infiltrar discos de hoja de soja o judía jóvenes. Después de 2 días de incubación a 25 °C con 16 h de luz, los discos de hoja se homogenizaron en solución tampón de PBS para extraer la proteína. A continuación, las proteínas solubles se sometieron a ensayo para determinar la actividad luciferasa usando el STEADY-GLO® Luciferase Assay System de Promega. La actividad luciferasa, promedio de tres conjuntos independientes de discos de hoja de soja infiltrados para cada vector, se muestra en la Figura 1. Pbdc6 y Pbdc7 exhibieron actividad comparable con Pubi3 de Arabidopsis. Pbdc6 (SEQ ID NO: 1) se obtuvo de Glyma03g34310 que codifica una proteína intrínseca de tonoplasto gamma. Pbdc6 (SEQ ID NO: 2) se obtuvo de Glyma23g42220 que codifica una proteína intrínseca de la membrana plasmática.

Ejemplo 2. Análisis *in planta*

Las secuencias de ADN que llevan los promotores Pbdc6 y Pbdc7, respectivamente, se clonaron en pSZ8133 para unir estos promotores con grg23Ace5. Los vectores binarios resultantes, pSZ8806 y pSZ8807, se transformaron en LBA4404 de *Agrobacterium* y se usaron para generar plantas de soja transgénicas. Se ensayaron aproximadamente 150 eventos transgénicos para cada vector con 4X pulverizaciones de glifosato. La resistencia a glifosato 4X se puntuó una semana después de la pulverización (Tabla 2, 0 significa sin resistencia y 4 representa la mayor resistencia). Se usó UBQ3 como control. De nuevo Pbdc6 y Pbdc7 mostraron una resistencia comparable a la de Pubi3At.

Tabla 2. Resistencia a glifosato 4x (representado como porcentaje de la puntuación de las plantas en cada una de las categorías)

Vectores	promotores	0	1+	2+	3+	2+ o 3+
pSZ8133	Pubi3At	50 %	14 %	20 %	16 %	36 %
pSZ8806	Pbdc6	54 %	8 %	24 %	14 %	39 %
pSZ8807	Pbdc7	44 %	13 %	21 %	22 %	43 %

Aunque la invención anterior se ha descrito en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con el fin de facilitar su comprensión, será obvio que se pueden realizar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer CropScience LP zhang, Shirong

<120> PROMOTORES DE LA SOJA CONSTITUTIVOS

<130> 2912939-20179WO01

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1230

ES 2 702 289 T3

<212> ADN
<213> Glycine max

<400> 1
ctcgaaacag aatatagcag tgattccagg tgcacggtgc cacctgtttg ctaaaaaaca 60
aaaataattg aggggggttaa ctaagctaata ccaaaccaga gatcagagcg ggagattaat 120
tttaataatt ctcttagtct cttcattaag atcctttttt tcatatcaag ttaaacttta 180
tgcaaaatat catattttca tttcagaaaa acaaaaaagc tactgtacat acaacattaa 240
gtttaaaata aacaagtaca gtttaccac gtgtcagtcg cggctttgta ataatacctg 300
cttttttccg gtgggtcacc agagagtcac agtgcttatc cccttatctc attcattata 360
ttatgatgaa ttatgccctt ataattatag attaactact actttgcagt tataaaccta 420
aaattcacaa ttctctctat tttttctttg cacacgcgat ataataaaa actctagagc 480
tatcgtcatt cacaacttta aaaaaattaa aaaagttaat tatattagag tgcaatagct 540
cactctcttt ctctcacgga accatccaga tatacaaaaa agactagaca atgtccactt 600
atcagcggc tacatggctc ttatccatct cggacacgtg tcagtcctgg gacggctctg 660
gccccaaacga ttcgctgtct taagagcaac caacagtgat gtggggatat actccttggt 720
ttttttttct tcaataaatt atgtataatg tatttataat ataatttttt tacttttaaa 780
ataattattc tgtatagttt cgatgataat ttatgctaaa tgtttatgta aaattattta 840
cactttttta tacatagaca ttaacttttt ttctctcata aatgttttaa ataaaaggaa 900
aaacaattaa taatttgaaa tgaagaacct gtcccaggct gtcaccaa ataggattctt 960
cttttccggc ttgggtgttt tgaaaaactt gattcctgac atttttggaa gcattgcgca 1020
tattttccaa ataggaaaat aaaaataacc gggaaccggg tacagccggg ggaatcctag 1080
gcaggctcgt cttcaatcac ggtatataag aagctacgaa gcgaaaacga atagcatagc 1140
gaaacagaga gtgggtttcag tgagtgatcg gtgttcactt gatccttcat aagtcgtcat 1200
5 catcatcatc atcatcaccg ttgattgaag 1230

<210> 2
<211> 1688
<212> ADN
<213> Glycine max

<400> 2

ES 2 702 289 T3

ctaacgtttt tggctcacia ctcaaactga tcaagaacct ttcattttat taacgttatc	60
cttacaagtc actcagacta atcaaggcac taaactaatg catattaggt aatgcaaata	120
aataatgacg ctcccatgaa tattcaaagt gtttcttttg ctttttgctt aacgactttt	180
gtatctctac gaattacttg agaaaaagct gctattatta ttatccaact atataaacia	240
atgaaagcta cagttaagga catggcctat taacaatata tgtagacttg atcattgtct	300
catccacgag atagaaacia aatatataaa agggctcatt atgcttattt agttcaagga	360
agagaggaaa atgagttatg catgtagcca gaatgaacat ttgatcatgg acgtgagata	420
agttaatcgc tgacagccat gtgccgacca tgtttttata aatgaaaaga aagaaagaaa	480
tgttcgtata taataattta cgggcacaag aaccttgcta ataattatca ttatcttttt	540
ttttttctg aaaaccttgt ttctctaate attgatgtat atttgtaate tctctcaac	600
tccttaccat gtagtgagga gtgaatttca tattaacatt ggtcattaca atattatcaa	660
ctttcgcgct aaatcagaat atatatataac tttcgcgcta aatattctta aaatattggt	720
attttggtag gtaaagattt acaatcacga ataagtaata aagaattttt catacgcatt	780
caatgattcc gaccatgtgt tatttgtttt gaaataccta tatgagagac tgagagcatc	840
ttgttattta tgactgctta ttaattttcc ctctatgcct tatctaatta gtttaaata	900
attttttctc cttgtataaa aaaaaattat gatttctcca accatacata ttagagaata	960
acttgaaatt atattcaacg tattaattgc attaccttta acgtgcaaaa ataataaata	1020
aaactaaaaa ctactacaat cataaatcgc gtgtggttga attgagacia attctattct	1080
aaaaaagaaa aacattaaca aaaagagaaa gaaaaaaaaa attgttgaca cctgacagcg	1140
gtaacaggga agtagcggta ggagattggc gtgtcggttt ccaactctgg aatccaacgt	1200
gccaactga gaatgcagga gaaagagaca cgtgtccaat tgcaggcgcg agttcaacgt	1260
gacaattcga aagccttgac aatcgaccgc cccagcatcg aacgcagaca aggaccacgt	1320
ggaattcggc cctgtatcc gtcaaaacgt tttttaccct cttcttcttc agttcttcca	1380
tttttatttt tttttcaaac cacagtaate caggttccag tgctgcgagg aacatggctg	1440
gtctttctag gagtggttgg aatcccgcca gctaggacia accccatcaa tcattggtcc	1500
ccatcaaaca aaaacatttt taaaaattca acatattacg ccacgggacc cacctccac	1560
caccctcac cctcacttct attaaactcaa acctattccg gttataaatc cgcaaccctc	1620
gttcttacta actcactcac tcacaactca gtgaaagaga atccgaggcg aagagaagag	1680
aaaaatta	1688

REIVINDICACIONES

1. Un casete de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 2;
- (b) una secuencia nucleotídica que comprende al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal; y
- (c) una secuencia nucleotídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal.

2. El casete de expresión de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia nucleotídica está unida funcionalmente a una secuencia nucleotídica heteróloga de interés.

3. Una célula vegetal que tiene incorporado de forma estable en su genoma el casete de expresión de la reivindicación 2.

4. La célula vegetal de la reivindicación 3, en la que dicha célula vegetal es de una planta dicotiledónea.

5. La célula vegetal de la reivindicación 4, en la que dicha planta dicotiledónea es la soja.

6. Una planta que tiene incorporado de forma estable en su genoma el casete de expresión de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia nucleotídica está unida funcionalmente a un ácido nucleico heterólogo de interés.

7. La planta de la reivindicación 6, en la que dicha planta es una planta dicotiledónea.

8. La planta de la reivindicación 7, en la que dicha planta dicotiledónea es la soja.

9. Semilla transgénica que comprende el casete de expresión de la reivindicación 1.

10. La planta de la reivindicación 6, en la que el ácido nucleico heterólogo de interés codifica un producto génico que confiere resistencia a herbicidas, sal, patógenos o plagas.

11. Un método para expresar una secuencia nucleotídica en una planta, comprendiendo dicho método introducir en una célula vegetal un casete de expresión que comprende un promotor unido funcionalmente a un ácido nucleico heterólogo de interés, en el que dicho promotor comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 2;
- (b) una secuencia nucleotídica que comprende al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal; y
- (c) una secuencia nucleotídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal; y regenerar una planta transformada a partir de dicha célula vegetal, en la que dicha planta tiene incorporado de forma estable en su genoma dicho casete de expresión.

12. Un método para expresar una secuencia nucleotídica en una célula vegetal, comprendiendo dicho método introducir en una célula vegetal un casete de expresión que comprende un promotor unido funcionalmente a un ácido nucleico heterólogo de interés, en el que dicho promotor comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) la secuencia nucleotídica expuesta en la SEQ ID NO: 2;
- (b) una secuencia nucleotídica que comprende al menos 50 nucleótidos contiguos de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal; y
- (c) una secuencia nucleotídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia inicia la transcripción constitutiva en una célula vegetal.

13. El método de la reivindicación 11 o 12, en el que dicha planta es una planta monocotiledónea, preferiblemente en el que dicha planta monocotiledónea es el maíz.

14. El método de la reivindicación 11 o 12, en el que dicha planta es una planta dicotiledónea.

15. El método de la reivindicación 11 o 12, en el que el ácido nucleico heterólogo codifica un producto génico que confiere resistencia a herbicidas o plagas.

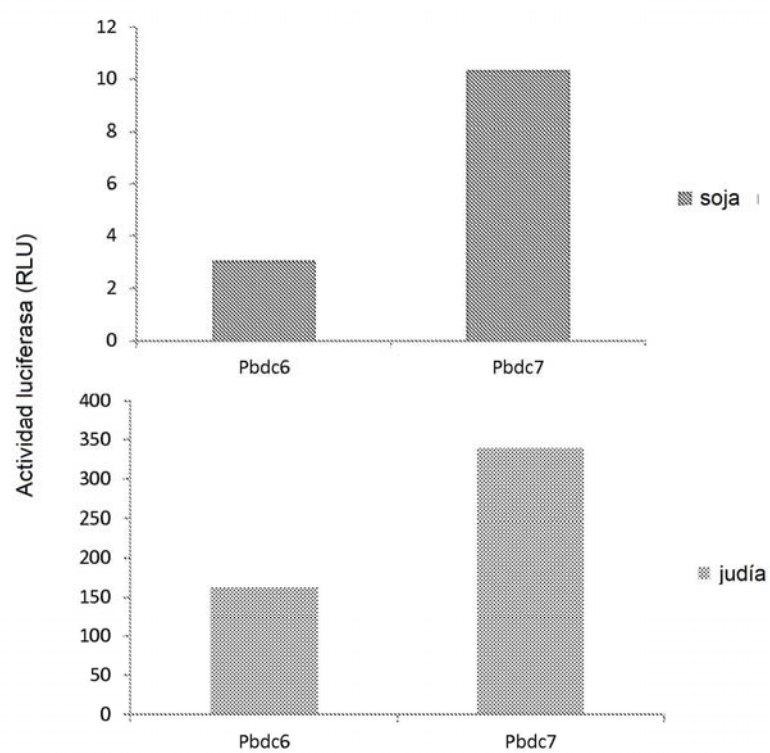


FIG. 1