

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 223**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/US2014/023648**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14159434**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14776232 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2970368**

54 Título: **Elementos reguladores de plantas y usos de los mismos**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361785268 P

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

10.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CHITTOOR, JAISHREE M.;
MIYAMOTO, AMY J.;
NICHOLS, AMY M.;
OUFATTOLE, MOHAMMED y
PETERSEN, MICHAEL W.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 741 223 T3

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

DESCRIPCIÓN

Elementos reguladores de plantas y usos de los mismos

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de la biología molecular de las plantas, la ingeniería genética de las plantas y las moléculas de ADN útiles para modular la expresión génica en plantas.

Antecedentes

10 Los elementos reguladores son elementos genéticos que regulan la actividad génica mediante la modulación de la transcripción de una molécula de ADN transcribible unida operativamente. Dichos elementos pueden incluir promotores, líderes, intrones, y regiones 3' no traducidas y son útiles en el campo de la biología molecular de plantas y en la ingeniería genética de plantas.

Sumario de la invención

15 La invención proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos aproximadamente el 85 por ciento de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de la SEQ ID NO: 22; (b) una secuencia de ADN que comprende cualquiera de la SEQ ID NO: 22; y (c) un fragmento de cualquiera de la SEQ ID NO: 22, en la que el fragmento tiene actividad reguladora de genes; en la que la secuencia de ADN está unida operativamente a una molécula de ADN transcribible heteróloga. Por "molécula de ADN transcribible heteróloga", se quiere decir que la molécula de ADN transcribible es heteróloga con respecto a la secuencia de ADN la que está unida operativamente. En realizaciones específicas, la molécula de ADN recombinante comprende una secuencia de ADN que tiene al menos el 90 por ciento, al menos el 91 por ciento, al menos el 92 por ciento, al menos el 93 por ciento, al menos el 94 por ciento, al menos el 95 por ciento, al menos el 96 por ciento, al menos el 97 por ciento, al menos el 98 por ciento o al menos el 99 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ADN de cualquiera de la SEQ ID NO: 22. En realizaciones particulares, la molécula de ADN transcribible heteróloga comprende un gen de interés agronómico, tal como un gen capaz de proporcionar resistencia herbicida o resistencia a plagas en plantas. En aún otras realizaciones, la invención proporciona una construcción que comprende una molécula de ADN recombinante como se proporciona en el presente documento.

20 En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan células vegetales transgénicas que comprenden una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos aproximadamente el 85 por ciento de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de la SEQ ID NO: 22; (b) una secuencia de ADN que comprende cualquiera de la SEQ ID NO: 22; y (c) un fragmento de cualquiera de la SEQ ID NO: 22, en la que el fragmento tiene actividad reguladora de genes; en la que la secuencia de ADN está unida operativamente a una molécula de ADN transcribible heteróloga. En determinadas realizaciones, la célula vegetal transgénica es una célula vegetal de monocotiledónea. En otras realizaciones, la célula vegetal transgénica es una célula vegetal de dicotiledónea.

35 En otro aspecto más adicional, se proporcionados en el presente documento adicionalmente una planta transgénica, o parte de la misma, que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada entre el grupo que consiste en: a) una secuencia con al menos el 85 por ciento de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de la SEQ ID NO: 22; b) una secuencia de ADN que comprende cualquiera de la SEQ ID NO: 22; y c) un fragmento de cualquiera de la SEQ ID NO: 22, en la que el fragmento tiene actividad reguladora de genes; en la que la secuencia de ADN está unida operativamente a una molécula de ADN transcribible heteróloga. En realizaciones específicas, la planta transgénica es una planta de progenie de cualquier generación relacionada con una planta transgénica de partida y comprende la molécula de ADN recombinante. También se proporciona en el presente documento una semilla transgénica que comprende la molécula de ADN recombinante que produce una planta transgénica de este tipo cuando se ha cultivado.

45 En otro aspecto más adicional, la invención proporciona un procedimiento de producción de una planta transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante de la invención que comprende transformar una célula vegetal con la molécula de ADN recombinante de la invención para producir una célula vegetal transformada y regenerar una planta transgénica a partir de la célula vegetal transformada.

Breve descripción de las figuras

50 **FIG. 1:** Muestra las configuraciones de casete de expresión de la invención.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1-30, 38-41, 49 y 56 son secuencias UTR 3'.

SEQ ID NO: 31, 35, 42, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54 y 55 son secuencias de ADN de grupos de elementos de expresión reguladores (EXP, por sus siglas en inglés) que comprende una secuencia promotora unida operativamente en

posición 5' a una secuencia líder, que está unida operativamente en posición 5' a una secuencia intrónica; o una secuencia promotora unida operativamente en posición 5' a una secuencia líder.

SEQ ID NO: 32, 36, y 43 son secuencias promotoras.

SEQ ID NO: 33 y 37 son secuencias líder.

5 SEQ ID NO: 34 es una secuencia intrónica.

SEQ ID NO: 44 es una secuencia codificante para β -glucuronidasa (GUS) que posee un intrón procesable.

SEQ ID NO: 45 y 46 son secuencias codificantes de luciferasa,

Descripción detallada de la invención

10 La invención proporciona moléculas de ADN que tienen actividad reguladora de genes en plantas. La secuencia de nucleótidos de la molécula de ADN se proporciona como la SEQ ID NO: 22.

15 Estas moléculas de ADN son capaces de alterar la expresión de una molécula de ADN transcribible unida operativamente en tejidos vegetales y, por tanto, regular la expresión génica de un transgén unido operativamente en plantas transgénicas. La invención también proporciona procedimientos para modificar, producir y utilizar las mismas. La invención también proporciona composiciones que incluyen células vegetales transgénicas, plantas, pastes de plantas y semillas que contienen las moléculas de ADN recombinantes, y procedimientos para preparar y usar las mismas.

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

20 Moléculas de ADN

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "ADN" o "molécula de ADN" se refiere a una molécula de ADN bicatenario de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases de desoxirribonucleótidos. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de ADN" se refiere a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN. La nomenclatura utilizada en el presente documento corresponde al artículo 1.822 del Título 37 del código de normativa federal de los Estados Unidos y como se expone en las tablas de la norma ST.25 de la WIPO (1998), Apéndice 2, Tablas 1 y 3.

30 Como se usa en el presente documento, una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que comprende una combinación de moléculas de ADN que no existirían de forma natural juntas sin la intervención humana. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante puede ser una molécula de ADN que está compuesta por al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí, una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que se desvía de las secuencias de ADN que existen en la naturaleza o una molécula de ADN que se ha incorporado en el ADN de una célula hospedadora mediante transformación genética.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "identidad de secuencia" se refiere a la medida en la que dos secuencias de ADN alineadas de manera óptima son idénticas. Una alineación de secuencia óptima se crea alineando manualmente dos secuencias, por ejemplo, una secuencia de referencia y otra secuencia de ADN, para maximizar el número de apareamientos de nucleótidos en la alineación de la secuencia con inserciones, deleciones, o huecos de nucleótidos internos adecuados. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia de ADN proporcionada como la SEQ ID NO: 22.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje de identidad" o "% de identidad" es la fracción de identidad multiplicada por 100. La "fracción de identidad" para una secuencia de ADN alineada de manera óptima con una secuencia de referencia es el número de correspondencias de nucleótidos en el alineamiento óptimo, dividido por el número total de nucleótidos en la secuencia de referencia, por ejemplo, el número total de nucleótidos en toda la longitud de la secuencia de referencia completa. Por tanto, una realización de la invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que, cuando se alinea de manera óptima con una secuencia de referencia, que se proporciona en el presente documento como la SEQ ID NO: 22, tiene al menos aproximadamente el 85 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 86 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 87 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 88 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 89 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 90 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 91 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 92 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 93 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 94 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 95 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 96 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 97 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 98 por ciento de identidad, al menos aproximadamente el 99 por ciento de identidad o al menos aproximadamente el 100 por ciento de identidad con respecto a la secuencia de referencia.

Elementos reguladores

- Los elementos reguladores tales como promotores, líderes, potenciadores, intrones y regiones de terminación de la transcripción (o UTR 3') desempeñan un papel integral en la expresión global de los genes en células vivas. La expresión "elemento regulador", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ADN que tiene actividad reguladora de genes. La expresión "actividad reguladora de genes", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de alterar la expresión de una molécula de ADN transcribible unida operativamente, por ejemplo, alterando la transcripción y/o traducción de la molécula de ADN transcribible unida operativamente. Los elementos reguladores, tales como promotores, líderes, potenciadores, y UTR 3' que funcionan en plantas son, por tanto, útiles para modificar fenotipos de plantas a través de ingeniería genética.
- Como se usa en el presente documento, un "grupo de elementos de expresión reguladores" o secuencia "EXP" puede referirse a un grupo de elementos reguladores unidos operativamente, tales como potenciadores, promotores, líderes e intrones. Por tanto, un grupo de elementos de expresión reguladores puede estar comprendido, por ejemplo, por un promotor unido operativamente en 5' a una secuencia líder, que a su vez está unido operativamente en 5' a una secuencia intrónica.
- Los elementos reguladores pueden caracterizarse por su patrón de expresión génica, por ejemplo, efectos positivos y/o negativos tales como la expresión constitutiva, temporal, espacial, de desarrollo, tisular, ambiental, fisiológica, patológica, de ciclo celular y/o químicamente sensible, y cualquier combinación de las mismas, así como mediante indicaciones cuantitativas o cualitativas. Como se usa en el presente documento, un "patrón de expresión génica" es cualquier patrón de transcripción de una molécula de ADN unida operativamente en una molécula de ARN transcrita. La molécula de ARN transcrita puede traducirse para producir una molécula de proteína o puede proporcionar una molécula de ARN antisentido u otra reguladora, tal como un ARN bicatenario (ARNbc), un ARN de transferencia (ARNt), un ARN ribosómico (ARNr), un microARN (miARN) y similares.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "expresión proteica" es cualquier patrón de traducción de una molécula de ARN transcrita en una molécula de proteína. La expresión de la proteína puede caracterizarse por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo o morfológicas, así como mediante indicaciones cuantitativas o cualitativas.
- Un promotor es útil como elemento regulador para modular la expresión de una molécula de ADN transcribible unida operativamente. Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere, en general, a una molécula de ADN que está implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa II y otras proteínas, tales como factores de transcripción que actúan en trans, para iniciar la transcripción. Un promotor puede identificarse inicialmente a partir de la región 5' no traducida (5' UTR) de un gen. Como alternativa, los promotores pueden ser moléculas de ADN producidas o manipuladas sintéticamente. Los promotores pueden ser también quiméricos. Los promotores quiméricos se producen mediante la fusión de dos o más moléculas de ADN heterólogas.
- Como se usa en el presente documento, las expresiones "molécula de terminación de la transcripción 3'", "región no traducida 3'" o "UTR 3'" en el presente documento se refieren a una molécula de ADN que se usa durante la transcripción a la región no traducida de la porción 3' de una molécula de ARNm. La región 3' no traducida de una molécula de ARNm puede generarse mediante escisión específica y poliadenilación en 3', también conocida como cola poliA. Una UTR 3' puede estar unida operativamente a y localizada corriente abajo de una molécula de ADN transcribible y puede incluir una señal de poliadenilación y otras señales reguladoras capaces de afectar a la transcripción, el procesamiento del ARNm o la expresión génica. Se piensa que las colas de poliA actúan en la estabilidad del ARNm y en el inicio de la traducción. Son ejemplos de moléculas de terminación de la transcripción 3' en la materia la región 3' de nopalina sintasa; la región 3' de hsp17 del trigo, la región 3' de la subunidad pequeña de la rubisco del guisante, la región 3' de E6 del algodón y la UTR 3' de la coixina.
- Las UTR 3' encuentran normalmente uso beneficioso para la expresión recombinante de moléculas de ADN específicas. Una UTR 3' débil tiene el potencial de generar una translectura, que puede afectar a la expresión de la molécula de ADN ubicada en los casetes de expresión adyacentes. El control adecuado de la terminación de la transcripción puede evitar la translectura en secuencias de ADN (por ejemplo, otros casetes de expresión) localizadas corriente abajo y puede permitir además un reciclado eficaz de la ARN polimerasa para mejorar la expresión génica. Una terminación eficaz de la transcripción (liberación de la ARN polimerasa II procedente del ADN) es el requisito previo para el reinicio de la transcripción y, por tanto, afecta directamente al nivel de transcripción global. Después de la terminación de la transcripción, el ARNm maduro se libera desde el sitio de síntesis y el molde se transporta al citoplasma. Los ARNm eucariotas se acumulan como formas de poli(A) *in vivo*, lo que dificulta la detección de los sitios de terminación de la transcripción mediante procedimientos convencionales. Sin embargo, la predicción de UTR 3' funcionales y eficaces mediante procedimientos bioinformáticos puede ser difícil ya que existen pocas secuencias de ADN conservadas que permitan una predicción fácil de una UTR 3' eficaz.
- Desde un punto de vista práctico, es normalmente beneficioso que una UTR 3' utilizada en un casete de expresión posea las siguientes características. La UTR 3' debería ser capaz de terminar de manera eficaz y efectiva la transcripción del transgén y evitar la translectura de la transcripción en cualquier secuencia de ADN adyacente, que puede estar compuesta por otro casete de expresión, como en el caso de los casetes de expresión múltiples que

residen en un ADN de transferencia (ADN-T), o en el ADN cromosómico adyacente en el que se ha insertado el ADN-T. En biotecnología de plantas, la UTR 3' se utilizan a menudo para cebar las reacciones de amplificación del ARN transcrito de manera inversa extraído de la planta transformada y se utiliza para: (1) evaluar la expresión o la actividad transcripcional del casete de expresión una vez integrado en el cromosoma de la planta; (2) evaluar el número de copias de inserciones en el ADN de la planta; y (3) evaluar la cigosidad de la semilla resultante tras el cultivo. La UTR 3' se utiliza también en reacciones de amplificación de ADN extraído de la planta transformada para caracterizar la integridad del casete insertado.

Como se usa en el presente documento, la expresión "potenciador" o "elemento potenciador" se refiere a un elemento regulador que actúa en cis, también conocido como elemento cis, que confiere un aspecto del modelo de expresión global, pero es habitualmente insuficiente solo para dirigir la transcripción, de una molécula de ADN transcribible unida operativamente. A diferencia de los promotores, los elementos potenciadores no incluyen habitualmente un sitio de inicio de la transcripción (TSS) o una caja TATA o secuencia de ADN equivalente. Un promotor o fragmento de promotor puede comprender naturalmente uno o más elementos potenciadores que alteran la transcripción de una molécula de ADN transcribible unida operativamente. Un elemento potenciador puede también fusionarse con un promotor para producir un elemento promotor quimérico en cis, que confiere un aspecto de la modulación global de la expresión génica.

Se cree que muchos elementos potenciadores promotores se unen a las proteínas de unión al ADN y/o alteran la topología del ADN, produciendo conformaciones locales que permiten o restringen selectivamente el acceso de la ARN polimerasa al molde de ADN o que facilitan la apertura selectiva de la doble hélice en el sitio de inicio de la transcripción. Un elemento potenciador puede actuar para unir los factores de transcripción que regulan la transcripción. Algunos elementos potenciadores se unen con más de un factor de transcripción, y los factores de transcripción pueden interactuar con diferentes afinidades con más de un dominio potenciador. Los elementos potenciadores pueden identificarse mediante varias técnicas, incluyendo el análisis de las supresiones, es decir, la supresión de uno o más nucleótidos del extremo 5' o internos a un promotor; el análisis de las proteínas de unión al ADN utilizando la huella de la DNasa I, la interferencia de metilación, los ensayos de cambio de movilidad por electroforesis, la huella genómica *in vivo* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediada por ligadura, y otros ensayos convencionales; o mediante el análisis de similitud de secuencias de ADN utilizando motivos de elementos en cis conocidos o elementos potenciadores como una secuencia diana o un motivo diana con procedimientos de comparación de secuencias de ADN convencionales, tales como BLAST. La estructura fina de un dominio potenciador puede estudiarse adicionalmente mediante mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o mediante otros procedimientos convencionales conocidos en la materia. Los elementos potenciadores se pueden obtener mediante síntesis química o mediante el aislamiento de elementos reguladores que incluyen dichos elementos, y se pueden sintetizar con nucleótidos flanqueantes adicionales que contienen sitios útiles de enzimas de restricción para facilitar la manipulación de la subsecuencia. Por tanto, el diseño, la construcción y la utilización de elementos potenciadores de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento para modular la expresión de moléculas de ADN transcribibles unidas operativamente están abarcados en la invención.

Como se usa en el presente documento, el término "quimérico" se refiere a una única molécula de ADN producida mediante la fusión de una primera molécula de ADN con una segunda molécula de ADN, en la que ni la primera ni la segunda molécula de ADN se encontrarían normalmente en esa configuración, es decir, fusionadas a la otra. La molécula de ADN quimérico es por tanto una nueva molécula de ADN que no se encuentra normalmente de otra forma en la naturaleza. Como se usa en el presente documento, la expresión "promotor quimérico" se refiere a un promotor producido mediante dicha manipulación de moléculas de ADN. Un promotor quimérico puede combinar dos o más fragmentos de ADN, por ejemplo, la fusión de un promotor con un elemento potenciador. Por tanto, el diseño, la construcción y el uso de promotores quiméricos de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento para modular la expresión de moléculas de ADN transcribibles unidas operativamente están abarcados en la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a una segunda molécula de ADN, tal como un elemento regulador, que es de composición similar, pero no son idénticas a, una primera molécula de ADN, y en la que la segunda molécula de ADN aún mantiene la funcionalidad general, es decir, un patrón de expresión igual o similar, por ejemplo, a través de una actividad transcripcional o traduccional más o menos o equivalente, de la primera molécula de ADN. Una variante puede ser una versión más corta o truncada de la primera molécula de ADN y/o una versión alterada de la secuencia de la primera molécula de ADN, como una con diferentes sitios de enzimas de restricción y/o supresiones internas, sustituciones y/o inserciones. Una "variante" puede también abarcar un elemento regulador que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, supresión y/o inserción de uno o más nucleótidos de una secuencia de referencia, en la que el elemento regulador derivado tiene actividad de la transcripción o la traducción mayor o menor o equivalente a la molécula reguladora precursora correspondiente. Las "variantes" de elementos reguladores también abarcan variantes que surgen de mutaciones que ocurren durante o como resultado de la transformación de células bacterianas y vegetales. En la invención, una secuencia de ADN proporcionada como la SEQ ID NO: 22 puede usarse para crear variantes que tienen una composición similar, pero no son idénticas a, la secuencia de ADN del elemento regulador original, mientras se mantiene la funcionalidad general, es decir, un patrón de expresión igual o similar, del elemento regulador original. La producción de dichas variantes de la invención está dentro de la experiencia habitual de la técnica a la luz de la divulgación y está abarcada dentro del ámbito de la invención.

Los elementos reguladores quiméricos pueden diseñarse para comprender varios elementos constituyentes que pueden unirse operativamente mediante diversos procedimientos conocidos en la materia, tales como la digestión y la ligadura mediante enzimas de restricción, la clonación independiente de ligadura, el ensamblaje modular de productos de la PCR durante la amplificación, o la síntesis química directa del elemento regulador quimérico, así como otros procedimientos conocidos en la materia. Los diversos elementos reguladores quiméricos resultantes pueden comprender el mismo, o variantes del mismo, elementos constituyentes, pero que difieren en la secuencia de ADN o secuencias de ADN que comprenden la secuencia o secuencias de ADN de enlace que permiten que las partes constituyentes se unan operativamente. En la invención, una secuencia de ADN proporcionada como la SEQ ID NO: 22 puede proporcionar una secuencia de referenciad de elemento regulador, en la que los elementos constituyentes que comprenden la secuencia de referencia pueden unirse mediante procedimientos conocidos en la materia y pueden comprender sustituciones, supresiones y/o inserciones de uno o más nucleótidos o mutaciones que se producen de forma natural en la transformación de células bacterianas y vegetales.

La eficacia de las modificaciones, duplicaciones o supresiones descritas en el presente documento sobre los aspectos de la expresión deseados de una molécula de ADN transcribible particular puede someterse a ensayo empíricamente en ensayos de plantas estables y transitorios, tales como los descritos en los ejemplos de trabajo en el presente documento, con el fin de validar los resultados, que pueden variar dependiendo de los cambios realizados y del objetivo del cambio en la molécula de ADN de partida.

Construcciones

Como se usa en el presente documento, el término "construcción" significa cualquier molécula de ADN recombinante tal como un plásmido, cósmido, virus, fago o molécula de ADN o ARN lineal o circular, procedente de cualquier fuente, con capacidad de integración genómica o replicación autónoma, que comprende una molécula de ADN en la que al menos una molécula de ADN se ha unido a otra molécula de ADN de una manera funcionalmente operativa, es decir, unidos operativamente. Como se usa en el presente documento, el término "vector" significa cualquier construcción que puede utilizarse para el fin de la transformación, es decir, la introducción de ADN o ARN heterólogo en una célula hospedadora. Una construcción normalmente incluye uno o más casetes de expresión. Como se usa en el presente documento, un "casete de expresión" se refiere a una molécula de ADN que comprende al menos una molécula de ADN transcribible unida operativamente a uno o más elementos reguladores, normalmente al menos un promotor y una UTR 3'.

Como se usa en el presente documento, la expresión "unida operativamente" se refiere a una primera molécula de ADN unida a una segunda molécula de ADN, en la que la primera y la segunda molécula de ADN están dispuestas de manera que la primera molécula de ADN altere la función de la segunda molécula de ADN. Las dos moléculas de ADN pueden ser o no parte de una única molécula de ADN contigua y pueden ser o no adyacentes. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una molécula de ADN transcribible si el promotor es capaz de afectar a la transcripción o la traducción de la molécula de ADN transcribible.

Las construcciones de la invención pueden proporcionarse, en una realización, como construcciones del borde de plásmidos inductores de tumores (Ti) que tienen las regiones del borde derecho (RB o AGRtu.RB) y del borde izquierdo (LB o AGRtu.LB) del plásmido Ti aislado de *Agrobacterium tumefaciens* que comprende un AND-T que, que junto con las moléculas de transferencia proporcionadas por las células de *A. tumefaciens*, permiten la integración del ADN-T en el genoma de una célula vegetal (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 6.603.061). Las construcciones pueden contener también segmentos de ADN de la cadena principal del plásmido que proporcionan función de replicación y selección antibiótica en células bacterianas, por ejemplo, un origen de replicación de *Escherichia coli* tal como ori322, un origen de replicación de amplio rango de hospedador tal como oriV u oriRi, y una región codificante para un marcador seleccionable como Spec/Strp que codifica la aminoglucósido adeniltransferasa (*aadA*) de Tn7 que confiere resistencia a la espectinomicina o estreptomycinina o un gen marcador seleccionable de gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación de plantas, la cepa bacteriana hospedadora con frecuencia es *A. tumefaciens* ABI, C58 o LBA4404; sin embargo, otras cepas conocidas por los expertos en la materia de la transformación de plantas pueden funcionar en la invención.

Se conocen en la materia procedimientos para ensamblar e introducir construcciones en una célula de manera que la molécula de ADN transcribible se transcriba en una molécula de ARNm funcional que se traduce y expresa como una proteína. Para la práctica de la invención, las composiciones y procedimientos convencionales para preparar y utilizar construcciones y células huésped son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, Los vectores típicos útiles para la expresión de ácidos nucleicos en plantas superiores son bien conocidos en la materia e incluyen vectores procedentes del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* y el vector de control de transferencia pCaMVCN.

Pueden incluirse varios elementos reguladores en una construcción, incluyendo cualquiera de los proporcionados en el presente documento. Cualquiera de dichos elementos reguladores puede proporcionarse en combinación con otros elementos reguladores. Dichas combinaciones se pueden diseñar o modificar para producir características reguladoras deseables. En una realización, las construcciones de la invención comprenden al menos un elemento regulador unido operativamente a una molécula de ADN transcribible unida operativamente a una UTR 3'.

Las construcciones de la invención pueden incluir cualquier promotor o líder conocido en la técnica.

Los casetes de expresión también pueden incluir una secuencia codificante de péptidos de tránsito que codifica un péptido que es útil para la orientación subcelular de una proteína unida operativamente, particularmente a un cloroplasto, leucoplasto u otro orgánulo plastídico; mitocondria; peroxisoma; vacuola; o una localización extracelular. Muchas proteínas localizadas en cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se dirigen al cloroplasto mediante un péptido de tránsito del cloroplasto (CTP, por sus siglas en inglés). Los ejemplos de dichas proteínas de cloroplasto aisladas incluyen, pero sin limitación, las asociadas con la subunidad pequeña (SSU, por sus siglas en inglés) de la ribulosa-1,5,-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, la proteína I y la proteína II del complejo recolector de luz, tiorredoxina F y enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS, por sus siglas en inglés). Los péptidos de tránsito de cloroplastos se describen, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 7.193.133. Se ha demostrado que las proteínas no cloroplásticas pueden dirigirse al cloroplasto mediante la expresión de un CTP heterólogo unido operativamente a la molécula de ADN transcribible que codifica proteínas no cloroplásticas.

Moléculas de ADN transcribibles

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ADN transcribible" se refiere a cualquier molécula de ADN capaz de transcribirse en una molécula de ARN, incluyendo, pero sin limitación, las que tienen secuencias codificantes de proteínas y las que producen moléculas de ARN que tienen secuencias útiles para la supresión génica. El tipo de molécula de ADN puede incluir, pero sin limitación, una molécula de ADN de la misma planta, una molécula de ADN de otra planta, una molécula de ADN de un organismo diferente o una molécula de ADN sintética, tal como una molécula de ADN que contiene un mensaje antisentido de un gen o una molécula de ADN que codifica una versión artificial, sintética o modificada de otro modo de un transgén. Las moléculas de ADN transcribibles de ejemplo para la incorporación en construcciones de la invención incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN o genes de una especie distinta de la especie en la que se incorpora la molécula de ADN o genes que se originan a partir de, o están presentes en, la misma especie, pero que se incorporan en células receptoras mediante procedimientos de ingeniería genética en lugar de técnicas de reproducción clásicas.

Un "transgén" se refiere a una molécula de ADN transcribible heteróloga para una célula huésped al menos con respecto a su localización en el genoma de la célula huésped y/o una molécula de ADN transcribible incorporada artificialmente en el genoma de una célula huésped en la generación actual o cualquier generación anterior de la célula.

Un elemento regulador, tal como un promotor de la invención, puede unirse operativamente a una molécula de ADN transcribible que es heteróloga con respecto al elemento regulador. Como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" se refiere a la combinación de dos o más moléculas de ADN cuando una combinación de este tipo no se encuentra normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, las dos moléculas de ADN pueden proceder de diferentes especies y/o las dos moléculas de ADN pueden proceder de diferentes genes, por ejemplo, diferentes genes de la misma especie o los mismos genes de diferentes especies. Por tanto, un elemento regulador es heterólogo con respecto a una molécula de ADN transcribible unida operativamente si dicha combinación normalmente no se encuentra en la naturaleza, es decir, la molécula de ADN transcribible no se produce de manera natural unida operativamente al elemento regulador.

La molécula de ADN transcribible puede ser en general cualquier molécula de ADN para la que se desee la expresión de un transcrito. Dicha expresión de un transcrito puede dar como resultado la traducción de la molécula de ARNm resultante y, por tanto, la expresión de proteínas. Como alternativa, por ejemplo, una molécula de ADN transcribible puede diseñarse para provocar en última instancia una expresión disminuida de un gen o proteína específico. En una realización, esto puede lograrse utilizando una molécula de ADN transcribible que esté orientada en la dirección antisentido. Un experto en la materia está familiarizado con la utilización de dicha tecnología antisentido. Cualquier gen puede regularse negativamente de esta manera, y, en una realización, una molécula de ADN transcribible puede diseñarse para la supresión de un gen específico mediante la expresión de una molécula de ARNbc, ARNip o miARN.

Por tanto, una realización de la invención es una molécula de ADN recombinante que comprende un elemento regulador de la invención, tal con los proporcionados como la SEQ ID NO: 22, unido operativamente a una molécula de ADN transcribible heteróloga para modular la transcripción de la molécula de ADN transcribible a un nivel deseado o en un patrón deseado cuando la construcción se integra en el genoma de una célula vegetal transgénica. En una realización, la molécula de ADN transcribible comprende una región codificadora de proteínas de un gen y, en otra realización, la molécula de ADN transcribible comprende una región antisentido de un gen.

Genes de interés agronómico

Una molécula de ADN transcribible puede ser un gen de interés agronómico. Como se usa en el presente documento, la expresión "gen de interés agronómico" se refiere a una molécula de ADN transcribible que, cuando se expresa en un tejido, célula o tipo celular vegetal particular, confiere una característica deseable. El producto de un gen de interés agronómico puede actuar dentro de la planta con el fin de provocar un efecto en la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo, rendimiento, composición del grano, perfil nutritivo, resistencia a enfermedades o plagas y/o tolerancia ambiental o química de las plantas o puede actuar como agente pesticida en la dieta de una plaga que se alimenta de la planta. En una realización de la invención, un elemento regulador de la invención se incorpora a una construcción de manera que el elemento regulador está unido operativamente a una molécula de ADN transcribible que es un gen

de interés agronómico. En una planta transgénica que contiene una construcción de este tipo, la expresión del gen de interés agronómico puede conferir un rasgo agronómico beneficioso. Un rasgo agronómico beneficioso puede incluir, por ejemplo, pero sin limitación, tolerancia a herbicidas, control de insectos, rendimiento modificado, resistencia a enfermedades, resistencia a patógenos, crecimiento y desarrollo de la planta modificada, contenido de almidón modificado, contenido de aceite modificado, contenido de ácidos grasos modificado, contenido de proteína modificado, maduración del fruto modificado, nutrición animal y humana potenciada, producciones de biopolímeros, resistencia al estrés ambiental, péptidos farmacéuticos, cualidades de procesamiento mejoradas, sabor mejorado, utilidad de producción de semillas híbridas, producción de fibra mejorada y producción de biocombustible deseable.

Los ejemplos de genes de interés agronómico conocidos en la materia incluyen aquellos para la resistencia a herbicidas (Patentes de los EE.UU. N.º 6.803.501; 6.448.476; 6.248.876; 6.225.114; 6.107.549; 5.866.775; 5.804.425; 5.633.435; y 5.463.175), el rendimiento aumentado (Patentes de los EE.UU. N.º USRE38.446; 6.716.474; 6.663.906; 6.476.295; 6.441.277; 6.423.828; 6.399.330; 6.372.211; 6.235.971; 6.222.098; y 5.716.837), el control de insectos (Patentes de los EE.UU. N.º 6.809.078; 6.713.063; 6.686.452; 6.657.046; 6.645.497; 6.642.030; 6.639.054; 6.620.988; 6.593.293; 6.555.655; 6.538.109; 6.537.756; 6.521.442; 6.501.009; 6.468.523; 6.326.351; 6.313.378; 6.284.949; 6.281.016; 6.248.536; 6.242.241; 6.221.649; 6.177.615; 6.156.573; 6.153.814; 6.110.464; 6.093.695; 6.063.756; 6.063.597; 6.023.013; 5.959.091; 5.942.664; 5.942.658, 5.880.275; 5.763.245; y 5.763.241), la resistencia a enfermedades fúngicas, (Patentes de los EE.UU. n.º 6.653.280; 6.573.361; 6.506.962; 6.316.407; 6.215.048; 5.516.671; 5.773.696; 6.121.436; 6.316.407; y 6.506.962), la resistencia a virus (Patentes de los EE.UU. n.º 6.617.496; 6.608.241; 6.015.940; 6.013.864; 5.850.023; y 5.304.730), la resistencia a nematodos (Patente de los EE.UU. N.º 6.228.992), la resistencia a enfermedades bacterianas (Patente de los EE.UU. N.º 5.516.671), el crecimiento y desarrollo de las plantas (Patentes de los EE.UU. N.º 6.723.897 y 6.518.488), la producción de almidón (Patentes de los EE.UU. N.º 6.538.181; 6.538.179; 6.538.178; 5.750.876; 6.476.295), la producción de aceites modificados (Patentes de los EE.UU. N.º 6.444.876; 6.426.447; y 6.380.462), la alta producción de aceite (Patentes de los EE.UU. N.º 6.495.739; 5.608.149; 6.483.008; y 6.476.295), el contenido de ácidos grasos modificado (Patentes de los EE.UU. N.º 6.828.475; 6.822.141; 6.770.465; 6.706.950; 6.660.849; 6.596.538; 6.589.767; 6.537.750; 6.489.461; y 6.459.018), la alta producción de proteínas (Patente de los EE.UU. N.º 6.380.466), la maduración de los frutos (Patente de los EE.UU. N.º 5.512.466), la nutrición animal y humana potenciadas (Patentes de los EE.UU. N.º 6.723.837; 6.653.530; 6.5412.59; 5.985.605; y 6.171.640), biopolímeros (Patentes de los EE.UU. N.º USRE37.543; 6.228.623; y 5.958.745 y 6.946.588), la resistencia al estrés ambiental (Patente de los EE.UU. N.º 6.072.103), péptidos farmacéuticos y péptidos secretables (Patentes de los EE.UU. N.º 6.812.379; 6.774.283; 6.140.075; y 6.080.560), los rasgos de procesamiento mejorados (Patente de los EE.UU. N.º 6.476.295), la digestibilidad mejorada (Patente de los EE.UU. N.º 6.531.648) baja rafinosa (Patente de los EE.UU. N.º 6.166.292), la producción enzimática industrial (Patente de los EE.UU. N.º 5.543.576), el sabor mejorado (Patente de los EE.UU. N.º 6.011.199), la fijación de nitrógeno (Patente de los EE.UU. N.º 5.229.114), la producción de semillas híbridas (Patente de los EE.UU. N.º 5.689.041), la producción de fibra (Patentes de los EE.UU. N.º 6.576.818; 6.271.443; 5.981.834; y 5.869.720) y la producción de biofuel (Patente de los EE.UU. N.º 5.998.700).

Como alternativa, un gen de interés agronómico puede alterar las características o el fenotipo de las plantas anteriormente mencionado mediante la codificación de una molécula de ARN que produce la modulación dirigida de la expresión génica de un gen endógeno, por ejemplo, por ARN inhibidor ("ARNi", incluyendo la modulación de la expresión génica por mecanismos mediados por miARN, ARNip, ARNip trans-actuante y ARNp en fase) antisentido (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.107.065); por ejemplo, como se describe en las solicitudes publicadas U.S. 2006/0200878 y U.S. 2008/0066206, y en la solicitud de Patente de los EE.UU. 11/974.469); o mecanismos mediados por cosupresión. El ARN podría ser también una molécula de ARN catalítico (por ejemplo, una ribozima o un riboswitch; véase, por ejemplo, el documento U.S. 2006/0200878) diseñado mediante ingeniería genética para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. Se conocen en la materia procedimientos para construir e introducir construcciones en una célula de manera que la molécula de ADN transcribible se transcriba en una molécula que sea capaz de provocar supresión génica.

Marcadores seleccionables

Los transgenes marcadores seleccionables también se pueden utilizar con los elementos reguladores de la invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "transgén marcador seleccionable" se refiere a cualquier molécula de ADN transcribible cuya expresión en una planta, tejido o célula transgénica, o la falta de la misma, puede evaluarse o puntuarse de alguna manera. Los genes marcadores seleccionables, y sus técnicas de selección y cribado asociadas, para su uso en la práctica de la invención son conocidos en la materia e incluyen, pero sin limitación, moléculas de ADN transcribible que codifican β -glucuronidasa (GUS), luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), proteínas que confieren resistencia a antibióticos y proteínas que confieren tolerancia a herbicidas.

Transformación celular

La invención también se refiere a un procedimiento para producir células y plantas transformadas que comprenden uno o más elementos reguladores unidos operativamente a una molécula de ADN transcribible.

El término "transformación" se refiere a la introducción de una molécula de ADN en un huésped receptor. Como se usa en el presente documento, el término "huésped" se refiere a bacterias, hongos o plantas, incluyendo cualquier

célula, tejidos, órgano o descendencia de las bacterias, hongos o plantas. Los tejidos y células vegetales de particular interés incluyen protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, plántulas, embriones y polen.

Como se usa en el presente documento, el término "transformado" se refiere a una célula, tejido, órgano u organismo en el que se ha introducido una molécula de ADN extraña, tal como una construcción. La molécula de ADN introducida puede integrarse en el ADN genómico de la célula, el tejido, el órgano o el organismo receptores de manera que la progenie posterior herede la molécula de ADN introducida. Un célula u organismo "transgénico" o "transformado" puede incluir también la progenie de la célula u organismo y la progenie producida a partir de un programa de cultivo que emplea dicho organismo transgénico como un precursor en un cruce y que presenta un fenotipo alterado que resulta de la presencia de una molécula de ADN extraña. La molécula de ADN introducida también puede introducirse de forma transitoria en la célula receptora de manera que la progenie posterior no herede la molécula de ADN introducida. El término "transgénico" se refiere a una bacteria, hongo o planta que contiene una o más moléculas de ADN heterólogas.

Existen muchos procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia para introducir moléculas de ADN en células vegetales. El procedimiento comprende en general las etapas de seleccionar una célula huésped adecuada, transformar la célula huésped con un vector y obtener la célula huésped transformada. Los procedimientos y materiales para transformar células vegetales mediante la introducción de una construcción en un genoma de plantas en la práctica de la presente invención pueden incluir cualquiera de los procedimientos bien conocidos y demostrados. Los procedimientos adecuados incluyen, pero sin limitación, infección bacteriana (por ejemplo, *Agrobacterium*), vectores binarios BAC, entrega directo de ADN (por ejemplo, mediante transformación mediada por PEG, captación de ADN mediada por desecación/inhibición, electroporación, agitación con fibras de carburo de silicio, y aceleración de partículas recubiertas de ADN), entre otros.

Las células huésped pueden ser cualquier célula u organismo, tal como una célula vegetal, célula de algas, célula fúngica, hongos, célula bacteriana o célula de insecto. En realizaciones específicas, las células huésped y las células transformadas pueden incluir células vegetales de cultivo.

Una planta transgénica posteriormente puede regenerarse a partir de una célula vegetal transgénica de la invención. Utilizando técnicas de reproducción convencionales o autopolinización, se pueden producir semillas a partir de esta planta transgénica. Dicha semilla, y la progenie resultante cultivada a partir de dicha semilla, contendrá la molécula de ADN recombinante de la invención y, por tanto, será transgénica.

Las plantas transgénicas de la invención pueden autopolinizarse para proporcionar semillas para plantas transgénicas homocigotas de la invención (homocigotas para la molécula de ADN recombinante) o cruzarse con plantas no transgénicas o diferentes plantas transgénicas para proporcionar semillas para las plantas transgénicas heterocigotas de la invención (heterocigotas para la molécula de ADN recombinante). Tanto las plantas transgénicas homocigotas como las heterocigotas se denominan en el presente documento "plantas progenie". Las plantas de progenie son plantas transgénicas que descienden de la planta transgénica original y que contienen la molécula de ADN recombinante de la invención. Las semillas producidas utilizando una planta transgénica de la invención pueden cosecharse y utilizarse para crecer generaciones de plantas transgénicas, es decir, plantas de progenie de la invención, que comprenden la construcción de la presente invención y expresan un gen de interés agronómico. Pueden encontrarse descripciones de los procedimientos reproductivos que se utilizan habitualmente para los diferentes cultivos en uno de varios libros de referencia, véase, por ejemplo, Allard, *Principles of Plant Breeding*, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98 (1960); Simmonds, *Principles of Crop Improvement*, Longman, Inc., NY, 369-399 (1979); Sneep y Hendriksen, *Plant breeding Perspectives*, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing y Documentation (1979); Fehr, *Soybeans: Improvement, Production y Uses*, 2ª Edición, Monografía, 16:249 (1987); Fehr, *Principles of Variety Development, Theory y Technique*, (Vol. 1) y *Crop Species Soybean* (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987).

Las plantas transformadas pueden analizarse para determinar la presencia del gen o genes de interés y el nivel de expresión y/o perfil conferido por los elementos reguladores de la invención. Los expertos en la materia conocen los numerosos procedimientos disponibles para el análisis de las plantas transformadas. Por ejemplo, los procedimientos para el análisis de plantas incluyen, pero sin limitación, transferencias de Southern o transferencias de Northern, estrategias basadas en la PCR, análisis bioquímicos, procedimientos de cribado fenotípico, evaluaciones de campo y ensayos inmunodiagnósticos. La expresión de una molécula de ADN transcribible puede medirse usando reactivos y procedimientos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) descritos por el fabricante y tiempos de ciclo de PCR determinados usando la Matriz de Ensayo TaqMan®. Como alternativa, pueden usarse los reactivos y procedimientos Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) descritos por el fabricante para evaluar la expresión transgénica.

La invención también proporciona partes de una planta de la invención. Las partes de plantas incluyen, pero sin limitación, hojas, tallos, raíces, tubérculos, semillas, endospermo, óvulos y polen. Las partes de planta de la invención pueden ser viables, no viables, regenerables y/o no regenerables. La invención también incluye y proporciona células vegetales transformadas que comprenden una molécula de ADN de la invención. Las células vegetales transformadas o transgénicas de la invención incluyen células vegetales regenerables y/o no regenerables.

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación y clonación de elementos reguladores

Se identificaron y clonaron grupos de elementos de expresión reguladores (EXP, por sus siglas en inglés) y regiones de terminación de la transcripción (UTR 3', por sus siglas en inglés) a partir del ADN genómico de la especie dicotiledónea *Medicago truncatula* (Barrel Medic). La selección de los 3' UTR de *Medicago truncatula* se basó, en parte, en patrones de expresión observados en genes de soja homólogos.

La identificación y clonación de 3' UTR de *Medicago truncatula* comenzó con la selección de genes de soja basándose en el patrón de expresión de genes de soja en estudios en tejido de soja y experimentos de perfilado de transcritos patentados. Los genes de soja seleccionados después se usaron para encontrar genes homólogos en *Medicago truncatula* usando secuencias de ADN disponibles públicamente. A continuación, se aislaron muestras de tejido de *Medicago truncatula* de plantas cultivadas con diferentes condiciones ambientales. Después, se aisló ARN mensajero (ARNm) de tejidos de *Medicago* y se usaron en experimentos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para determinar el patrón de expresión de los genes de *Medicago*. A partir de estos experimentos, se seleccionó un subconjunto del genoma de *Medicago truncatula* para su clonación y caracterización.

Usando datos de secuencia de *Medicago truncatula* públicos, se realizó un análisis bioinformático para identificar elementos reguladores dentro de los loci de genes de *Medicago* seleccionados. Por ejemplo, se realizó un análisis bioinformático para identificar secuencias UTR 3' que comprenden las regiones de poliadenilación y terminación del ARNm y secuencias que se extienden adicionalmente al extremo del locus del gen identificado. Después se diseñaron cebadores de amplificación y se usaron para amplificar cada uno de los fragmentos de ADN de elemento regulador identificados, tales como los fragmentos de ADN UTR 3', fragmentos de ADN que comprenden un promotor, líder e intrón, y fragmentos de ADN que comprenden un promotor y líder. Los fragmentos de ADN resultantes se ligaron en vectores de expresión de plantas de base y se secuenciaron.

Para fragmentos de ADN aplicables, después se realizó un análisis del sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés) del elemento regulador y las uniones de corte y empalme intrón/exón usando protoplastos de plantas transformadas. En este análisis, los protoplastos se transformaron con los vectores de expresión de plantas que comprendían los fragmentos de ADN clonados unidos operativamente a una molécula de ADN transcribible heteróloga. A continuación, se usó el sistema 5' RACE para la amplificación rápida de extremos de ADNc, Versión 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, California 92008) para confirmar el elemento regulador TSS y las uniones de corte y empalme intrón/exón mediante el análisis de la secuencia de ADN de los transcritos de ARNm producidos.

Las secuencias de ADN de las UTR 3' identificadas se proporcionan en el presente documento como las SEQ ID NO: 1-30. Además, en el presente documento se proporcionan secuencias de ADN promotoras identificadas como las SEQ ID NO: 32 y 36; en el presente documento se proporcionan secuencias de ADN líderes identificadas como las SEQ ID NO: 33 y 37; y se proporciona una secuencia intrónica de ADN como la SEQ ID NO: 34. Adicionalmente, las secuencias de ADN de los EXP identificados se proporcionan en el presente documento como la SEQ ID NO: 31 y 35. El grupo de elementos de expresión reguladores EXP-Mt.Ubq2-1:1:2 (SEQ ID NO: 31) comprende un elemento promotor, P-Mt.Ubq2-1:1:1 (SEQ ID NO: 32), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-Mt.Ubq2-1:1:1 (SEQ ID NO: 33), unido operativamente en 5' a un elemento intrónico, I-Mt.Ubq2-1:1:2 (SEQ ID NO: 34) y el grupo de elementos de expresión reguladores EXP-Mt.AC145767v28:1:1 (SEQ ID NO: 35) comprende un elemento promotor, P-Mt.AC145767v28-1:2:1 (SEQ ID NO: 36), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 37). Cada una de las secuencias de ADN identificadas y clonadas a partir de *Medicago truncatulas* e enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. UTR 3', Grupos de elementos de expresión reguladores, promotores, líderes e intrones clonados a partir de *Medicago truncatula*.

Descripción	SEQ ID NO:	Comentario
T-MtAC145767v28-1:1:2	1	AC145767.28
T-MtAC140914v20-1:2:1	2	AC140914.20
T-MT.AC139600v16-1:2:1	3	AC139600.16
T-MtAC153125V10-1:2:1	4	AC153125.10
T-Mt.Apx-1:1:2	5	ascorbato peroxidasa citosólica
T-Mt.EF1a-1:1:2	6	factor de elongación 1 alfa
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	oxidoreductasa putativa
T-Mt.FBA-1:1:5	8	fructosa bifosfato aldolasa, isozime citoplasmática 2
T-Mt.FBA-1:2:1	9	fructosa bifosfato aldolasa, isozime citoplasmática 2
T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
T-Mt.Gpi-1:2:1	11	proteína anclada a GPI

(continuación)

Descripción	SEQ ID NO:	Comentario
T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	proteína de choque térmico 20
T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	precursor de tipo II de proteína de unión a clorofila a/b
T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	lipoxigenasa,
T-Mt.Methm-1:2:1	15	5-metiltetrahidropteriloliglutamato-homocisteína S-metiltransferasa
T-Mt.MP21-1:2:1	16	proteína de maduración de semillas
T-Mt.Oxr-1:2:1	17	oxidorreductasa putativa
T-Mt.Pip1-1:2:1	18	proteína integral de membrana plasmática
T-MtPrx-1:1:1	19	peroxidasa
T-Mt.PSII-T_A-1:2:1	20	proteína de 5 kDa del fotosistema II, precursor de cloroplastos
T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	proteína de 5 kDa del fotosistema II, precursor de cloroplastos
T-Mt.Pt1-1:2:2	22	Transportador de fosfato
T-Mt.Pt2-1:2:2	23	Transportador de fosfato
T-Mt.RD22-1:2:1	24	proteína sensible a la deshidratación
T-Mt.RpL3-1:2:1	25	proteína ribosómica L3
T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	proteína Sali3-2 inducida por aluminio
T-Mt.Scp-1:2:1	27	proteína relacionada con la serina carboxipeptidasa
T-Mt.SeqID#21-1:2:1	28	peroxidasa
T-Mt.Sui1-1:1:2	29	factor de iniciación de la traducción SUI1
T-Mt.Zfp-1:2:1	30	proteína de dedos de cinc de tipo CCCH
EXP-Mt.Ubq2-1:2	31	Ubiquitina 2
P-Mt.Ubq2-1:1:1	32	Ubiquitina 2
L-Mt.Ubq2-1:1:1	33	Ubiquitina 2
I-Mt.Ubq2-1:1:2	34	Ubiquitina 2
EXP-Mt.AC145767v28-1:1	35	AC145767.28
P-Mt.AC145767v28-1:2:1	36	AC145767.28
L-Mt.AC145767v28-1:1:2	37	AC145767.28

Ejemplo 2**Análisis del efecto de las UTR 3' sobre la expresión GUS constitutiva en protoplastos de hojas de soja**

5 Se transformaron protoplastos de hojas de soja con vectores, específicamente construcciones plasmídicas, para evaluar el efecto de los 3' UTR *Medicago truncatula* sobre la expresión. Se transformaron protoplastos de hojas de soja con vectores de ADN que contenían una secuencia EXP constitutiva que impulsa la expresión del transgén de β -glucuronidasa (GUS) unido operativamente a un 3' UTR de *Medicago*. Estos protoplastos de hojas de soja transformados con 3' UTR de *Medicago* se compararon con protoplasto de hojas de soja en el que la expresión del transgén GUS estaba impulsada por un promotor constitutivo, y el transgén GUS se unió operativamente a UTR 3' derivado de *Gossypium hirsutum* o *Gossypium barbadense*.

10 Los vectores de plantas utilizados en estos experimentos se construyeron usando procedimientos de clonación conocidos en la técnica. Los vectores resultantes comprendían una región del borde izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens*; un primer casete de expresión del transgén para la selección de células vegetales transformadas que transmite resistencia al herbicida glifosato o el antibiótico espectinomicina (ambos impulsados por el promotor de Actina 7 de *Arabidopsis*); un segundo casete de expresión de transgén utilizado para evaluar la actividad de la UTR 3', que comprendían un EXP o una secuencia promotora unidos operativamente en 5' a una secuencia de ADN para GUS que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 44), que se une operativamente en 5' a UTR 3' derivado de *Medicago truncatula*, *Gossypium hirsutum* o *Gossypium barbadense*; y una región del borde derecho de *A. tumefaciens*. Los vectores que comprendían un UTR 3' derivado de *Medicago* (es decir, pMON109593, pMON116803, pMON116812, pMON116813, pMON116815, pMON116826, pMON116827, pMON116830, pMON122852, pMON122853, pMON122854, pMON122855, pMON122856, pMON122857, pMON122858, pMON122859, pMON122862, pMON122864, pMON122865, pMON122866, pMON122867 y pMON122868) utilizaron el grupo de elementos de expresión reguladores constitutivos EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42) para impulsar GUS. Los vectores que comprendían un UTR 3' derivado de *Gossypium hirsutum* o *Gossypium barbadense* (es decir, pMON81345, pMON81347 y pMON83002) utilizaron el promotor constitutivo P-CaMV.35S-enh-1:1:11 (SEQ ID NO: 43) para impulsar GUS.

La Tabla 2 proporciona las construcciones plasmídicas con el UTR 3' y la SEQ ID NO correspondientes utilizados para transformar los protoplastos de soja en experimentos presentados en este Ejemplo.

Tabla 2. Construcciones plasmídicas utilizadas para transformar protoplastos de hojas de soja y descripciones de UTR 3'.

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:
pMON81345	T-Gb.FbL2-1:1:1	41
pMON81347	T-Gh.E6-4A-0:2:1	38
pMON83002	T-Gb.H6-1:2:1	39
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13
pMON116813	T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11
pMON116830	T-Mt.Scp-1:2:1	27
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7

- 5 También se construyeron dos vectores de plantas, específicamente construcciones plasmídicas, para su uso en la cotransformación y la normalización de datos usando procedimientos de clonación conocidos en la técnica. Cada una de estas construcciones plasmídicas contenía una secuencia codificante de luciferasa específica que estaba impulsada por un EXP constitutivo. El vector de planta pMON19437 comprendía un casete de expresión con un EXP constitutivo que comprende un promotor unido operativamente en 5' a una secuencia líder que está unida operativamente en 5' a un intrón (EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1, SEQ ID NO: 47), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) (LUCIFERASE: 1:3, SEQ ID NO: 45), unido operativamente en 5' a un UTR 3' del gen de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 49). El vector de planta de pMON63934 que comprendía un casete de expresión con una secuencia EXP constitutiva que comprende un promotor unido operativamente en 5' a una secuencia líder (EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1, SEQ ID NO: 48), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de luciferasa de pluma marina (*Renilla reniformis*) (CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1, SEQ ID NO: 46), unido operativamente en 5' a un UTR 3' del gen de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 49).

Los protoplastos de hojas de soja se transformaron usando un procedimiento de transformación basado en polietilenglicol (PEG), como es bien sabido en la técnica. Cada célula de protoplasto se transformó con la construcción plasmídica pMON19437, la construcción plasmídica pMON63934 y una de las construcciones plasmídicas presentadas en la Tabla 2. Después de la transformación, los protoplastos de hojas de soja transformados se incubaron durante la noche en oscuridad total. A continuación, se realizó la medición de GUS y luciferasa mediante la colocación de alícuotas de una preparación lisada de células transformadas en dos bandejas de pocillos pequeños diferentes. Se usó una bandeja para mediciones de GUS y se usó una segunda bandeja para realizar un doble ensayo de luciferasa usando el sistema de doble ensayo de indicador de luciferasa (Promega Corp., Madison, WI; véase, por ejemplo, Promega Notes Magazine, N.º: 57, 1996, pág. 02).

Se realizaron una o dos transformaciones para cada construcción plasmídica presentada en la Tabla 2. Los valores

de expresión medios para cada UTR 3' se determinaron a partir de varias muestras de cada transformación. Se realizaron mediciones de las muestras usando cuatro duplicados de cada transformación de construcción plasmídica, o como alternativa, tres duplicados de cada construcción plasmídica por uno de dos experimentos de transformación. Los niveles medios de expresión de GUS y luciferasa se proporcionan en la Tabla 3. En esta Tabla, los valores de la luciferasa de luciérnaga (por ejemplo, procedentes de la expresión de pMON19437) se proporcionan en la columna etiquetada "FLuc" y los valores de la luciferasa de Renilla (por ejemplo, procedentes de la expresión de pMON63934) se proporcionan en la columna etiquetada "RLuc".

Tabla 3. Valores medios de ensayo de GUS y Luciferasa en protoplastos de hojas de soja transformados.

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	GUS	FLuc	RLuc
pMON81345	T-Gb.FbL2-1:1:1	41	795	2332,5	3701
pMON81347	T-Gh.E6-4A-0:2:1	38	73	584,3	802
pMON83002	T-Gb.H6-1:2:1	39	91	1142,8	1995
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	4783	3619	12341
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	15053	4801,7	15876
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	9771	4202,3	10976
pMON116813	T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	7482	3347,3	8395
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	30469	6428	17764
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	22330	3580,5	9984
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	269	343,7	478
pMON116830	T-Mt.Scp-1:2:1	27	3909	4683,7	10180
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	33403	11049	28226
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	12833	11198	22722
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	14811	8775,5	25229
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	40383	17826	50299
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	21870	16141,3	56362
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	24386	6782,7	15024
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	30753	12929,8	40571
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	14499	5586,7	15222
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	27768	14680	35263
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	40579	15837,7	36515
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	34867	17285,5	52519
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	33664	11923	27663
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	7088	9885,3	19590
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	14539	7563,5	22320

Adicionalmente, para comparar la actividad relativa de cada UTR 3', se expresaron valores de GUS como una relación de la actividad de GUS con respecto a la de la luciferasa y se normalizaron al UTR 3' *no-Medicago* de mejor expresión, es decir, T-Gb.FbL2-1:1:1 (SEQ ID NO: 41). La Tabla 4 muestra las relaciones GUS/luciferasa y las relaciones normalizadas. De nuevo, en esta Tabla, los valores de luciferasa de luciérnaga se etiquetan "FLuc" y los valores de luciferasa de Renilla se etiquetan "RLuc".

Tabla 4. Relaciones GUS/FLuc y GUS/RLuc de expresión normalizados con respecto a T-Gb.FbL2-1:1:1 (SEQ ID NO: 41) en protoplastos de hojas de soja transformados.

Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	GUS/FLuc	GUS/RLuc	GUS/FLuc normalizado a T-Gb.FbL2-1:1:1	GUS/RLuc normalizado a T-Gb.FbL2-1:1:1
T-Gb.FbL2-1:1:1	41	0,34	0,21	1,00	1,00
T-Gh.E6-4A-0:2:1	38	0,12	0,09	0,37	0,42
T-Gb.H6-1:2:1	39	0,08	0,05	0,23	0,21
T-Mt.Pt1-1:2:2	22	1,32	0,39	3,88	1,80
T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	3,13	0,95	9,20	4,41
T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	2,33	0,89	6,82	4,14

(continuación)

Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	GUS/FLuc	GUS/RLuc	GUS/FLuc normalizado a T-Gb.FbL2-1:1:1	GUS/RLuc normalizado a T-Gb.FbL2-1:1:1
T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	2,24	0,89	6,56	4,15
T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	4,74	1,72	13,91	7,98
T-Mt.LoX-1-1:2:1	14	6,24	2,24	18,30	10,41
T-Mt.Gpi-1:2:1	11	0,78	0,56	2,30	2,62
T-Mt.Scp-1:2:1	27	0,83	0,38	2,45	1,79
T-Mt.Methm-1:2:1	15	3,02	1,18	8,87	5,51
T-Mt.Prx-1:1:1	19	1,15	0,56	3,36	2,63
T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	1,69	0,59	4,95	2,73
T-Mt.FBA-1:1:5	8	2,27	0,80	6,65	3,74
T-Mt.Zfp-1:2:1	30	1,35	0,39	3,98	1,81
T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	3,60	1,62	10,55	7,56
T-Mt.MP21-1:2:1	16	2,38	0,76	6,98	3,53
T-Mt.Oxr-1:2:1	17	2,60	0,95	7,61	4,43
T-Mt.Sui1-1:1:2	29	1,89	0,79	5,55	3,67
T-Mt.Pip1-1:2:1	18	2,56	1,11	7,52	5,17
T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	2,02	0,66	5,92	3,09
T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	2,82	1,22	8,28	5,67
T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	0,72	0,36	2,10	1,68
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	1,92	0,65	5,64	3,03

Como se demuestra en la Tabla 4, La expresión de GUS se potenció usando todas las UTR 3' de *Medicago* seleccionadas en comparación con las UTR 3' derivadas de *Gossypium hirsutum* o *Gossypium barbadense*. Por ejemplo, la expresión de GUS fue de 2,1 a 18,3 veces superior usando un UTR 3' derivado de *Medicago* basándose en las relaciones GUS/FLuc normalizadas con respecto a T-Gb.FbL2-1:1:1, los UTR 3' de mejor expresión de los derivados de *Gossypium hirsutum* o *Gossypium barbadense*. De forma similar, la expresión de GUS fue de 1,61 a 10,48 veces superior usando un UTR 3' derivado de *Medicago* basándose en las relaciones GUS/RLuc normalizadas con respecto a T-Gb.FbL2-1:1:1.

Ejemplo 3

10 Análisis del efecto de las UTR 3' sobre la expresión de GUS constitutivo en plantas de soja transformadas establemente

Se transformaron plantas de soja con vectores, específicamente construcciones plasmídicas, para evaluar el efecto de los 3' UTR *Medicago truncatula* sobre la expresión. Específicamente, se transformaron plantas de soja con vectores que contenían una secuencia EXP constitutiva que impulsa la expresión del transgén de β -glucuronidasa (GUS) unido operativamente a UTR 3' de *Medicago*. Estas plantas de soja transformadas con UTR 3' de *Medicago* se compararon con plantas de soja transformadas en las que la expresión del transgén de GUS se impulsó por un promotor constitutivo, y el transgén de GUS se unió operativamente a un UTR 3' derivado de *Gossypium barbadense*.

Los vectores de plantas utilizados en estos experimentos se construyeron usando procedimientos de clonación conocidos en la técnica. Los vectores resultantes comprendían una región del borde derecho de *A. tumefaciens*; un primer casete de expresión del transgén para la selección de células vegetales transformadas que transmite resistencia al antibiótico espectinomina (impulsada por el promotor de Actina 7 de *Arabidopsis*); un segundo casete de expresión de transgén utilizado para evaluar la actividad de la UTR 3', que comprendía el grupo de elementos de expresión reguladores EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42) unido operativamente en 5' a una secuencia de codificación para GUS que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 44), que está unido operativamente en 5' a un UTR 3' derivado de *Medicago truncatula* o *Gossypium barbadense*; y una región del borde derecho de *A. tumefaciens*. Los vectores que comprendían un UTR 3' derivado de *Medicago* eran pMON109593, pMON116803, pMON116812, pMON116813, pMON116815, pMON116826, pMON116827, pMON116830,

pMON122850, pMON122851, pMON122852, pMON122853, pMON122854, pMON122855, pMON122856, pMON122857, pMON122858, pMON122859, pMON122861, pMON122862, pMON122863, pMON122864, pMON122865, pMON122866, pMON122867 y pMON122868. El vector que comprendía un UTR 3' de *Gossypium barbadense* era pMON102167.

- 5 La Tabla 5 proporciona las construcciones plasmídicas con el UTR 3' y la SEQ ID NO correspondientes utilizados para transformar las plantas de soja en experimentos presentados en este Ejemplo.

Tabla 5. Construcciones plasmídicas utilizadas para transformar plantas de soja y las descripciones de UTR 3'.

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13
pMON116813	T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11
pMON116830	T-Mt.Scpl-1:2:1	27
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25
pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7

- 10 Las plantas de soja se transformaron usando procedimientos de transformación mediados por *Agrobacterium* conocidos en la técnica. La expresión de GUS se sometió a ensayo cualitativamente usando secciones histológicas de tejidos seleccionados. Para el análisis histoquímico de GUS, se incubaron secciones de tejido completo con la solución de tinción de GUS X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-glucuronido) (1 mg/ml) durante un período de tiempo apropiado, se aclararon y se inspeccionaron visualmente para determinar la coloración azul. La actividad GUS se determinó cualitativamente mediante inspección visual directa o inspección bajo un microscopio utilizando órganos y tejidos de plantas seleccionadas. Las plantas de la generación R₀ se observaron con respecto a expresión en raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Pecíolo R1, Flor R1, Embrión de vaina amarilla (etapa de desarrollo aproximadamente R8), Cotiledón de vaina amarilla (etapa de desarrollo aproximadamente R8), Semilla inmadura R3, Vaina R3 y Cotiledón R5.

- 20 También se analizaron los cambios cuantitativos de la expresión de GUS con respecto a la expresión transmitida por pMON102167, que comprendía el UTR 3' derivado de *Gossypium barbadense*, como se demuestra en las Tablas 6-13. Para este análisis cuantitativo, se extrajo la proteína total de tejidos seleccionados entre plantas transformadas. Se usó un microgramo de proteína total con el sustrato fluorógeno 4-metilumbeliferil-β-D-glucuronido (MUG) en un volumen de reacción total de 50 µl. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), tiene fluorescencia máxima a pH elevado, cuando el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de una solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente. La fluorescencia se midió con

excitación a 365 nm, emisión a 445 nm utilizando un Fluoromax-3 (Horiba; Kioto, Japón) con un lector Micromax, con una anchura de rendija configurada para una excitación de 2 nm y una emisión de 3 nm.

Las Tablas 6 y 7 muestran los niveles de expresión cuantitativos medios medidos en los tejidos de plantas de generación R₀. Los tejidos no sometidos a ensayo se muestran como celdas en blanco en ambas tablas.

Tabla 6. Expresión media de GUS en plantas de generación R₀ en Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Pecíolo R1 y Flor R1.

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	Raíz Vn5	Hoja sumidero Vn5	Hoja fuente Vn5	Hoja fuente R1	Pecíolo R1	Flor R1
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	400,90	551,61	605,29	350,93		412,30
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	740,77	654,50	946,25	579,76	342,11	215,37
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	1306,76	2269,95	2187,61	344,78	480,47	243,11
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	649,15	785,16	1103,30	644,76	297,30	294,38
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	382,80	891,91	1026,78	262,82	253,94	179,31
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	3817,28	1939,40	3250,38	1393,65	1001,37	876,08
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	1093,15	1626,41	2030,11	3315,25	1376,39	1980,93
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	839,31	1263,82	1172,16	617,58	457,17	235,01
pMON116830	T-Mt.Scg-1:2:1	27	240,31	187,07	330,49	113,50	20,79	41,73
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	479,50	673,20	687,00	388,10	524,10	202,68
pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24	897,98	287,52	667,63	325,50	1056,16	407,35
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	852,05	1003,70	456,38	883,30	560,70	184,02
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	858,88	591,51	362,40	841,82	459,48	220,29
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	957,90	910,53	343,90	583,62	570,15	198,11
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	1293,27	396,14	338,26	167,55	113,14	94,21
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	254,48	250,56	154,27	425,90	223,53	115,33
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	1035,43	1014,18	579,85	1631,94	921,34	421,81
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	408,94	299,07	282,34	315,48	562,46	308,11
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	3228,98	1315,58	2092,77	849,69	406,58	98,10
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5	974,70	433,60	510,50	263,00	103,70	117,70
pMON122862	T-Mt.Suil-1:1:2	29	1131,24	710,62	604,88	342,22	182,58	219,67
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	667,00	281,00	398,30	171,40	323,10	281,30
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	448,00	203,00	240,00	401,00	369,00	355,00
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	385,42	160,51	298,16	239,01	104,64	32,62
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	2274,70	1176,10	1490,54	976,91	753,02	45,26
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	753,94	544,73	395,30	675,68	668,83	255,68
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	1151,60	608,21	692,82	235,62	87,40	157,45

Tabla 7. Expresión media de GUS en plantas de generación R₀ en Embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla, Semilla inmadura R₃, Vaina R₃ y Cotiledón R₅.

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	Embrión de vaina amarilla	Cotiledón de vaina amarilla	Semilla inmadura R ₃	Vaina R ₃	Cotiledón R ₅
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	47,86	49,45	67,45	433,54	101,34
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	18,56	170,11	28,63	406,13	71,91
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	100,42	181,62	209,92	467,72	190,51
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	74,53	120,30	163,76	526,08	407,40
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	127,65	279,84	78,12	282,34	50,92
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	358,03	1192,69	989,47	2309,72	566,93
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	280,48	577,87	231,15	2868,17	341,60
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	118,18	127,74	10,96	37,22	27,80
pMON116830	T-Mt.Scpl-1:2:1	27	57,11	72,33	23,96	271,88	98,36
pMON122850	T-Mt.Rpl3-1:2:1	25	265,30	489,70	57,40	487,50	264,40
pMON122851	T-Mt.RD2-1:2:1	24	95,88	189,41	121,12	1045,20	72,23
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	153,46	320,64	53,24	686,92	518,51
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	46,64	146,53	38,64	360,48	103,28
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	165,11	160,40	66,44	464,75	245,85
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	172,21	381,32	111,57	496,04	306,13
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	46,37	44,66	87,51	775,69	57,17
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	142,78	243,74	45,58	615,99	452,09
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	102,11	260,98	137,76	667,18	169,16
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	192,92	539,13	74,44	950,85	43,69
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5	53,50	217,70	37,90	95,30	174,50
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	195,81	502,37	62,10	135,60	500,71
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	136,80	270,20	127,20	387,10	150,00
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	140,00	220,00	87,00	398,00	102,00
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	20,55	56,64			11,83
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	126,53	334,27			59,33
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	136,36	242,52	77,11	509,01	73,23
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	201,21	186,14	208,37	1264,62	203,90

Como se demuestra en las Tablas 6 y 7, la expresión impulsada por el mismo EXP fue distinta en tejidos de plantas de soja transformadas establemente que comprenden diferentes UTR 3' de *Medicago* en comparación con las UTR 3' derivadas de *Gossypium barbadense*.

5 Las Tablas 8 y 9 muestran diferencias de expresión en número de veces en los tejidos de plantas de soja transformadas establemente que comprendían diferentes UTR 3' de *Medicago* en comparación con los 3' UTR derivados de *Gossypium barbadense*.

Tabla 8. Expresión en número de veces de plantas de soja transformadas de generación R₀ en Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Pecíolo R1 y Flor R1.

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	Raíz Vn5	Hoja Sumidero Vn5	Hoja fuente Vn5	Hoja Fuente R1	Flor R1
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	1,85	1,19	1,56	1,65	0,52
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	3,26	4,12	3,61	0,98	0,59
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	1,62	1,42	1,82	1,84	0,71
pMON116813	T-Mt.PSII-TB-1:2:1	21	0,95	1,62	1,70	0,75	0,43
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	9,52	3,52	5,37	3,97	2,12
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	2,73	2,95	3,35	9,45	4,80
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	2,09	2,29	1,94	1,76	0,57
pMON116830	T-Mt.Scp-1:2:1	27	0,60	0,34	0,55	0,32	0,10
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	1,20	1,22	1,14	1,11	0,49
pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24	2,24	0,52	1,10	0,93	0,99
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	2,13	1,82	0,75	2,52	0,45
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	2,14	1,07	0,60	2,40	0,53
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	2,39	1,65	0,57	1,66	0,48
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	3,23	0,72	0,56	0,48	0,23
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	0,63	0,45	0,25	1,21	0,28
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	2,58	1,84	0,96	4,65	1,02
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	1,02	0,54	0,47	0,90	0,75
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	8,05	2,39	3,46	2,42	0,24
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5	2,43	0,79	0,84	0,75	0,29
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	2,82	1,29	1,00	0,98	0,53
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	1,66	0,51	0,66	0,49	0,68
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	1,12	0,37	0,40	1,14	0,86
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	0,96	0,29	0,49	0,68	0,08
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	5,67	2,13	2,46	2,78	0,11
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	1,88	0,99	0,65	1,93	0,62
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	2,87	1,10	1,14	0,67	0,38

Tabla 9. Expresión en número de veces en plantas de soja transformadas de generación R₀ en embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla, Semilla inmadura R3, Vaina R3 y Cotiledón R5.

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	Embrión de vaina amarilla	Cotiledón de vaina amarilla	Semilla inmadura R3	Vaina R3	Cotiledón R5
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	0,39	3,44	0,42	0,94	0,71
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	2,10	3,67	3,11	1,08	1,88
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	1,56	2,43	2,43	1,21	4,02

10

(continuación)

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	Embrión de vaina amarilla	Cotiledón de vaina amarilla	Semilla inmadura R3	Vaina R3	Cotiledón R5
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	2,67	5,66	1,16	0,65	0,50
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	7,48	24,12	14,67	5,33	5,59
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	5,86	11,69	3,43	6,62	3,37
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	2,47	2,58	0,16	0,09	0,27
pMON116830	T-Mt.Scp-1:2:1	27	1,19	1,46	0,36	0,63	0,97
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	5,54	9,90	0,85	1,12	2,61
pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24	2,00	3,83	1,80	2,41	0,71
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	3,21	6,48	0,79	1,58	5,12
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	0,97	2,96	0,57	0,83	1,02
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	3,45	3,24	0,99	1,07	2,43
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	3,60	7,71	1,65	1,14	3,02
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	0,97	0,90	1,30	1,79	0,56
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	2,98	4,93	0,68	1,42	4,46
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	2,13	5,28	2,04	1,54	1,67
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	4,03	10,90	1,10	2,19	0,43
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5	1,12	4,40	0,56	0,22	1,72
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	4,09	10,16	0,92	0,31	4,94
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	2,86	5,46	1,89	0,89	1,48
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	2,93	4,45	1,29	0,92	1,01
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	0,43	1,15			0,12
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	2,64	6,76			0,59
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	2,85	4,90	1,14	1,17	0,72
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	4,20	3,76	3,09	2,92	2,01

5 Como se demuestra en las Tablas 8 y 9, la expresión en los tejidos de plantas de soja transformadas que comprendían UTR 3' de *Medicago* diferentes fue distinta en comparación con la de plantas de soja transformadas con pMON102167, que comprendían un UTR 3' derivado de *Gossypium barbadense*. Por ejemplo, dos UTR 3' de *Medicago*, T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) y T-Mt.Lox-1-1:2:1 (SEQ ID NO: 14) provocaron la expresión potenciada del EXP constitutivo, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42), en todos los tejidos. Otros UTR 3' de *Medicago* proporcionaron la expresión potenciada del EXP constitutivo en algunos tejidos, reduciendo al mismo tiempo la expresión en otros. Por ejemplo, el UTR 3' T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID NO: 26) proporcionó un aumento de 2,19 a 8,05 veces en la expresión en la Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Embrión de vaina amarilla y Cotiledón de vaina amarilla, reduciendo al mismo tiempo la expresión en la Flor R1 y el Cotiledón R5. Adicionalmente, el UTR 3' T-Mt.AC140914v20-1:2:1 (SEQ ID NO: 2) proporcionó un aumento de 1,88 a 4,12 veces en la expresión en la Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla, Semilla inmadura R3 y Cotiledón R5, reduciendo al mismo tiempo la expresión en la Hoja Fuente R1, la Flor R1, y manteniendo la expresión relativamente igual en la Vaina R3. Además, el UTR 3' T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17) proporcionó un aumento de 2,19 a 10,90 veces en la expresión en la Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla y Vaina R3, reduciendo al mismo tiempo la expresión en la Flor R1 y el Cotiledón R5, y manteniendo la expresión relativamente igual en la Semilla inmadura R3.

20 Algunas de las plantas de soja transformadas que comprendían diferentes 3' UTR de *Medicago* se llevaron a la generación R₁. Las Tablas 10 y 11 muestran los valores medios de expresión de GUS de los tejidos sometidos a ensayo. Las Tablas 12 y 13 muestran la diferencia en número de veces en la expresión con respecto al 3'UTR derivado de *Gossypium barbadense*.

Tabla 10. Expresión media de GUS en plantas de soja transformadas de generación R₁ en Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Pecíolo R1 y Flor R1.

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	Raíz Vn5	Hoja sumidero Vn5	Hoja fuente Vn5	Hoja fuente R1	Pecíolo R1	Flor R1
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	934,22	992,31	1210,30	856,01	570,64	603,61
pMON116813	T-Mt.PSII-TB-1:2:1	21	1462,92	1169,79	1495,65	1159,28	647,86	506,70
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	5555,77	5146,48	4447,42	2654,13	2825,41	2584,82
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	3726,08	3090,41	3862,55	2666,68	1160,66	1041,40
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	3438,35	2856,04	2510,49	2012,63	1087,69	919,57

Tabla 11. Expresión media de GUS en plantas de soja transformadas de generación R₁ en Embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla, Semilla inmadura R₃, Vaina R₃ y Cotiledón R₅.

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	Embrión de vaina amarilla	Cotiledón de vaina amarilla	Semilla inmadura R ₃	Vaina R ₃	Cotiledón R ₅
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	85,27	174,11	298,03	567,48	85,11
pMON116813	T-Mt.PSII-TB-1:2:1	21	468,66	537,77	171,00	976,84	342,29
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	1314,44	2134,97	1039,30	4506,45	1842,61
pMON122859	T-Mt.Oxc-1:2:1	17	730,81	1098,62	245,45	1947,45	423,40
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	686,08	988,27	488,62	1068,10	757,12

5 Como se demuestra en las Tablas 10 y 11, la expresión impulsada por el mismo EXP fue distinta en tejidos de plantas de soja transformadas establemente que comprenden diferentes UTR 3' de *Medicago* en comparación con las UTR 3' derivadas de *Gossypium barbadense*. Las Tablas 12 y 13 muestran las diferencias en número de veces en los tejidos de plantas de soja transformadas establemente que comprendían diferentes 3' UTR de *Medicago* con respecto a los tejidos transformados con pMON102167, que comprendían un UTR 3' derivado de *Gossypium barbadense*.

Tabla 12. Diferencias de expresión en número de veces en plantas de soja transformadas de generación R₁ en Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Peciolo R1 y R1.

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	Raíz Vn5	Hoja Sumidero Vn5	Hoja Fuente Vn5	Hoja Fuente R1	Peciolo R1	Flor R1
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	1,57	1,18	1,24	1,35	1,14	0,84
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	5,95	5,19	3,67	3,10	4,95	4,28
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	3,99	3,11	3,19	3,12	2,03	1,73
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	3,68	2,88	2,07	2,35	1,91	1,52

Tabla 13. Diferencias de expresión en número de veces en plantas de soja transformadas de generación R₁ en Embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla, Semilla inmadura R3, Vaina R3 y Cotiledón R5.

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	Embrión de vaina amarilla	Cotiledón de vaina amarilla	Semilla inmadura R3	Vaina R3	Cotiledón R5
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	5,50	3,09	0,57	1,72	4,02
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	15,42	12,26	3,49	7,94	21,65
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	8,57	6,31	0,82	3,43	4,97
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	8,05	5,68	1,64	1,88	8,90

10 Como se demuestra en las Tablas 12 y 13, varios de los 3' UTR de *Medicago* potenciaron la expresión del elemento de EXP constitutivo, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42), con respecto a plantas transformadas con pMON102167, que comprendían un UTR 3' derivado de *Gossypium barbadense* en la generación R₁. Por ejemplo, el UTR 3' T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) proporcionó una potenciación de 3,10 a 21,65 veces en la expresión de GUS en todos los tejidos sometidos a ensayo. La UTR 3' T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID NO: 26) proporcionó una potenciación de 1,52 a 8,90 veces en la expresión de GUS en todos los tejidos sometidos a ensayo. La UTR 3' T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17) proporcionó potenciación en la mayoría de los tejidos, pero una expresión reducida en la Semilla inmadura R3 con respecto a plantas transformadas con T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40).

20 Los experimentos anteriores demuestran que los elementos 3' UTR derivados de *Medicago truncatula* afectaron a la expresión del elemento de EXP constitutivo EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42) de diferentes maneras dependiendo de la UTR 3' específica seleccionada. En muchos casos, hubo una potenciación de la expresión en determinados tejidos de planta con vectores de expresión de plantas que comprendían un 3' UTR de *Medicago* con respecto a plantas transformadas con pMON102167, que comprendían un UTR 3' derivado de *Gossypium barbadense*. Sin embargo, el efecto de potenciación no se observó en todos los tejidos vegetales y, en muchos casos, la expresión se vio atenuada en algunos tejidos y potenciada en otros usando un 3' UTR de *Medicago*. Por tanto, el uso de 3' UTR de *Medicago* seleccionados permite un "ajuste fino" del perfil de expresión de un transgén particular y puede usarse en combinación con diferentes elementos de expresión, tales como promotores, líderes e intrones, en unión operativa con una molécula de ADN transcribible para proporcionar una expresión óptima en tejidos específicos, reduciendo al mismo tiempo la expresión en tejidos que son menos deseables para una molécula de ADN transcribible específica.

30 Ejemplo 4

Análisis del efecto de las UTR 3' sobre la expresión de GUS en semillas en plantas de soja transformadas establemente

35 Se transformaron plantas de soja con vectores, específicamente construcciones plasmídicas, para evaluar el efecto de los 3' UTR de *Medicago* sobre la expresión. Específicamente, se transformaron plantas de soja con vectores de ADN que contenían una secuencia EXP de expresión en semillas que impulsan la expresión del transgén de β -glucuronidasa (GUS) unido operativamente a un 3' UTR de *Medicago*. Estas plantas de soja transformadas con 3'

UTR de *Medicago* se compararon con plantas de soja transformadas en las que la expresión del transgén de GUS estaba impulsada por una secuencia EXP de expresión en semillas y el transgén GUS estaba unido operativamente a UTR 3' derivado de *Gossypium barbadense*.

5 Los vectores de plantas utilizados en estos experimentos se construyeron usando procedimientos de clonación conocidos en la técnica. Los vectores resultantes comprendían una región del borde derecho de *A. tumefaciens*; un primer casete de expresión del transgén para la selección de células vegetales transformadas que transmite resistencia al antibiótico espectinomocina (impulsada por el promotor de Actina 7 de *Arabidopsis*); un segundo casete de expresión de transgén utilizado para evaluar la actividad de la UTR 3', que comprendía el elemento de EXP, EXP-Gm.Sphasl:1:1 (SEQ ID NO: 50), que proporciona expresión preferentemente en semillas, unido operativamente en 5' a una secuencia codificante para GUS que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 44), que está unido operativamente en 5' a un UTR 3' derivado de *Medicago truncatula* o *Gossypium barbadense*; y una región del borde derecho de *A. tumefaciens*. Los vectores de expresión de plantas que comprendían un UTR 3' derivado de *Medicago* eran pMON116832, pMON116834, pMON116835, pMON116841, pMON122869, pMON122870, pMON122871, pMON122872, pMON122873, pMON122874, pMON122875, pMON122876, pMON122878, pMON122879, pMON122880, pMON122881, pMON122882, pMON122883, pMON122885, pMON122887, pMON122888 y pMON126122. El vector que comprendía un UTR 3' de *Gossypium barbadense* era pMON83028.

La Tabla 14 proporciona las construcciones plasmídicas con el correspondiente UTR 3', SEQ ID NO, y la generación para la que se proporcionan datos de ensayos cuantitativos.

Tabla 14. Construcciones plasmídicas utilizadas para transformar plantas de soja y UTR 3' correspondientes.

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	Generación para la que se proporcionan datos
pMON83028	T-Gb.E6-3b:1:1	40	R ₁
pMON116832	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	R ₀
pMON116834	T-Mt.PSII-T_A-1:2:1	20	R ₀
pMON116835	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	R ₀
pMON116841	T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	R ₀
pMON122869	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	R ₀
pMON122870	T-Mt.RD22-1:2:1	24	R ₀
pMON122871	T-Mt.Methm-1:2:1	15	R ₀
pMON122872	T-Mt.Prx-1:1:1	19	R ₀
pMON122873	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	R ₀
pMON122874	T-Mt.FBA-1:2:1	9	R ₀
pMON122875	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	R ₀ y R ₁
pMON122876	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	R ₀
pMON122878	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	R ₀
pMON122879	T-Mt.Apx-1:1:2	5	R ₀ y R ₁
pMON122880	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	R ₀ y R ₁
pMON122881	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	R ₀ y R ₁
pMON122882	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	R ₀
pMON122883	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	R ₀
pMON122885	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	R ₀
pMON122887	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	R ₀
pMON122888	T-Mt.Pt2-1:2:2	23	R ₀
pMON126122	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	R ₀

20 Las plantas de soja se transformaron y GUS se sometió a ensayo como se describe en el Ejemplo 3. Las Tablas 15 y 16 proporcionan los valores medios de GUS cuantitativos para la generación R₀ de plantas de soja transformadas establemente.

Tabla 15. Expresión media de GUS en generación R₀ de plantas de soja transformadas en Embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla, Semilla inmadura R3, Vaina R3 y Cotiledón R5.

Descripción de 3'UTR	SEQ ID NO:	Embrión de vaina amarilla	Cotiledón de vaina amarilla	Semilla inmadura R3	Vaina R3	Cotiledón R5
T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	572	1045	9	6	8
T-Mt.PSII-T_A-1:2:1	20	210	371	7	6	61
T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	1445	4264	11	8	47
T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	218	774	15	16	60
T-Mt.RpL3-1:2:1	25	683	1087			
T-Mt.RD22-1:2:1	24	3164	6809	30	15	24
T-Mt.Methm-1:2:1	15	459	2136	7	6	74
T-Mt.Prx-1:1:1	19	109	794	9	6	42
T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	241	745	6	5	
T-Mt.FBA-1:2:1	9	622	772	10	6	100
T-Mt.Zfp-1:2:1	30	192	193	2	2	31
T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	319	2150	8	6	157
T-Mt.Oxr-1:2:1	17	995	3220	5	4	235
T-Mt.Apx-1:1:2	5	41	272	10	9	10
T-Mt.Sui1-1:1:2	29	120	546	15	116	16
T-Mt.EF1a-1:1:2	6			10	9	17
T-Mt.Pip1-1:2:1	18	670	614	8	9	5
T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	2079	4192	8	6	62
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	385	1092	11	5	299
T-Mt.Pt1-1:2:2	22	142	630	14	14	426
T-Mt.Pt2-1:2:2	23	440	513	2	1	10
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	527	1122	15	6	154

Tabla 16. Expresión media de GUS en plantas de soja transformadas de generación R₀ en Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Pecíolo R1 y Flor R1.

Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	Raíz Vn5	Hoja Sumidero Vn5	Hoja fuente Vn5	Hoja Fuente R1	Pecíolo R1	Flor R1
T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	23	4	6	4	4	4
T-Mt.PSII-T_A-1:2:1	20	29	5	8	6	3	3
T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	10	3	4	0	0	0
T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	8	5	5	5	5	6
T-Mt.RpL3-1:2:1	25	60	26	22	7	8	9
T-Mt.RD22-1:2:1	24	21	2	3	12	11	11
T-Mt.Methm-1:2:1	15	8	4	4	0	0	0
T-Mt.Prx-1:1:1	19	5	5	5	0	0	0
T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	20	8	6	8	6	8
T-Mt.FBA-1:2:1	9	9	3	3	18	15	17
T-Mt.Zfp-1:2:1	30	41	13	14	7	5	6
T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	7	5	5	0	0	0
T-Mt.Oxr-1:2:1	17	7	3	8	0	0	0

(continuación)

Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	Raíz Vn5	Hoja Sumidero Vn5	Hoja fuente Vn5	Hoja Fuente R1	Peciolo R1	Flor R1
T-Mt.Apx-1:1:2	5	31	16	19	1173	294	357
T-Mt.Sui1-1:1:2	29	29	20	19	10	5	4
T-Mt.EF1a-1:1:2	6	8	3	3	16	19	19
T-Mt.Pip1-1:2:1	18	15	7	6	8	4	3
T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	16	5	3	0	0	0
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	22	8	10	6	3	3
T-Mt.Pt1-1:2:2	22	8	6	5	5	6	6
T-Mt.Pt2-1:2:2	23	34	11	11	6	6	6
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	15	6	8	5	4	4

Como puede observarse en las Tablas 15 y 16, la mayoría de los 3' UTR de *Medicago* afectaron a la expresión del elemento de EXP preferido en semillas, EXP-Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID NO: 50), solo en tejidos derivados de semillas, con la excepción de T-Mt.Apx-1:1:2 (SEQ ID NO: 5), que potenció la expresión de GUS en la Hoja fuente R1, Peciolo R1 y Flor R1. Varios 3' UTR de *Medicago* proporcionaron una alta expresión en el Embrión de vaina amarilla y Cotiledón de vaina amarilla, tales como T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1), T-Mt.RD22-1:2:1 (SEQ ID NO: 24), y T-Mt.AC153125V10-1:2:1 (SEQ ID NO: 4). Por tanto, estos UTR 3' puede ser ideal para potenciar la expresión de un promotor de semilla durante las etapas tardías del desarrollo de las semillas. La UTR 3' T-Mt.Expr1-1:2:1 (SEQ ID NO: 7) proporcionó una alta expresión tanto en Cotiledón R5 como en Cotiledón de vaina amarilla con respecto a muchos de las otras UTR 3' y, por tanto, puede ser útil para proporcionar una alta expresión en cotiledón para una ventana más amplia del desarrollo de semillas. En algunos casos, el UTR 3' proporcionó un nivel más uniforme de expresión en semillas tanto en el Embrión de vaina amarilla como el Cotiledón de vaina amarilla, tal como cuando se usaron T-Mt.FBA-1:2:1 (SEQ ID NO: 9), T-Mt.Zfp-1:2:1 (SEQ ID NO: 30), T-Mt.Pip1-1:2:1 (SEQ ID NO: 18) y T-Mt.Pt2-1:2:2 (SEQ ID NO: 23).

A las plantas de generación R₀ que comprendían T-Mt.Zfp-1:2:1 (SEQ ID NO: 30), T-Mt.Apx-1:1:2 (SEQ ID NO: 5), T-Mt.Sui1-1:1:2 (SEQ ID NO: 29) y T-Mt.EF1a-1:1:2 (SEQ ID NO: 6) se le permitió poner semillas y se plantaron para estudios de generación de R₁. La Tabla 17 muestra una comparación de los datos medios de ensayos cuantitativos para eventos que comprendían estas plantas de generación R₁ que comprendían 3' de UTR de *Medicago* y plantas transformadas con pMON83028, que comprendían el UTR 3' T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40) derivado de *Gossypium barbadense*.

Tabla 17. Expresión media de GUS en plantas de soja transformadas de generación R₁ en Embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla y Cotiledón R5.

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	SEQ ID NO:	Embrión de vaina amarilla	Cotiledón de vaina amarilla	Cotiledón R5
pMON83028	T-Gb.E6-3b:1:1	40	102	362	7
pMON122875	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	56	153	498
pMON122879	T-Mt.Apx-1:1:2	5	205	645	777
pMON122880	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	462	1241	355
pMON122881	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	415	1059	11

Como se puede observar en la Tabla 17, los 3' UTR de *Medicago* afectaron a la expresión de forma diferente a T-Gb.E6-3b:1:1 en los tejidos de embrión y cotiledón. Por ejemplo, T-Mt.Apx-1:1:2 (SEQ ID NO: 5) y T-Mt.Sui1-1:1:2 (SEQ ID NO: 29) potenciaron la expresión del elemento de EXP preferido en semillas en el Embrión de vaina amarilla, el Cotiledón de vaina amarilla y el Cotiledón R5 con respecto a T-Gb.E6-3b:1:1. T-Mt.EF1a-1:1:2 (SEQ ID NO: 6) potenció la expresión en el Embrión de vaina amarilla y el Cotiledón de vaina amarilla, pero no en el Cotiledón R5. T-Mt.Zfp-1:2:1 (SEQ ID NO: 30) redujo la expresión en el Embrión de vaina amarilla y el Cotiledón de vaina amarilla de desarrollo tardío, pero potenció la expresión en el Cotiledón R5.

Por tanto, cada uno de los diferentes 3' UTR de *Medicago* afecta a la expresión de forma diferencial en las semillas en desarrollo cuando están unidos operativamente con un promotor preferido en semillas. Estas diferencias en el efecto sobre la expresión pueden utilizarse para proporcionar un enfoque más refinado y personalizado de la expresión de semillas y pueden ser ideales para el "ajuste fino" del perfil de expresión de moléculas de ADN transcribibles específicas donde se desea la expresión en semillas.

Ejemplo 5**Análisis del efecto de las UTR 3' sobre la expresión de GUS constitutiva en plantas de soja transformadas establemente.**

- 5 Se transformaron plantas de soja con vectores, específicamente construcciones plasmídicas, para evaluar el efecto de los 3' UTR *Medicago truncatula* sobre la expresión. Específicamente, Se transformaron plantas de soja con vectores que contenían dos elementos EXP diferentes que presentaban un perfil de expresión constitutivo que impulsa la expresión del transgén de β -glucuronidasa (GUS) unido operativamente a un UTR 3' de *Medicago*. Estas plantas transformadas con 3' UTR de *Medicago* se compararon con plantas de soja transformadas en las que la expresión del transgén de GUS estaba unida operativamente a un UTR 3' derivado de *Gossypium barbadense*.
- 10 Los vectores de plantas utilizados en estos experimentos se construyeron usando procedimientos de clonación conocidos en la técnica. Los vectores resultantes comprendían una región del borde derecho de *A. tumefaciens*; un primer casete de expresión del transgén para la selección de células vegetales transformadas que transmite resistencia al antibiótico espectinomicina (impulsada por el promotor de Actina 7 de *Arabidopsis*); un segundo casete de expresión de transgén utilizado para evaluar la actividad de la UTR 3', que comprendía los elementos de EXP EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42) o EXP-DaMV.FLT:1:2 (SEQ ID NO: 51) unidos operativamente en 5' a una secuencia codificante para GUS que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 44), que está unido operativamente en 5' a un UTR 3' derivado de *Medicago truncatula* o *Gossypium barbadense*; y una región del borde derecho de *A. tumefaciens*. Los vectores que comprendían un UTR 3' derivado de *Medicago* eran pMON118768, pMON153701 y pMON116803. Los vectores que comprendían un UTR 3' de *Gossypium barbadense* eran pMON121042 y pMON102167.

La Tabla 18 proporciona las construcciones plasmídicas con el elemento de EXP, el UTR 3' y la SEQ ID NO correspondientes utilizados para transformar las plantas de soja presentadas en este Ejemplo.

Tabla 18. Construcciones plasmídicas utilizadas para transformar plantas de soja y el elemento de EXP y el UTR 3' correspondientes.

Construcción plasmídica	Descripción de EXP	EXP SEQ ID NO:	Descripción de UTR 3'	UTR 3' SEQ ID NO:
pMON121042	EXP-DaMV.FLT:1:2	51	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON118768	EXP-DaMV.FLT:1:2	51	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26
pMON153701	EXP-DaMV.FLT:1:2	51	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2
pMON102167	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON122866	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26
pMON116803	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2

- 25 Las plantas se transformaron y GUS se sometió a ensayo como se describe en el Ejemplo 3. Las Tablas 19 y 20 proporcionan los valores medios de GUS cuantitativos para la generación R₀ de plantas de soja transformadas establemente.

Tabla 19. Expresión media de GUS en plantas de soja transformadas de generación R₀ en Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Peciolo R1 y Flor R1.

Descripción de EXP	Descripción de UTR 3'	Raíz Vn5	Hoja Sumidero Vn5	Hoja Fuente Vn5	Hoja Fuente R1	Peciolo R1	Flor R1
EXP-DaMV.FLT: 1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	780,79	688,93	509,35	320,02	379,69	467,94
EXP-DaMV.FLT: 1:2	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	4782,43	1009,59	1208,48	363,55	1425,76	1398,80
EXP-DaMV.FLT: 1:2	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	3792,66	725,38	1106,9	1831,99	4792,28	739,97
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	400,90	551,61	605,29	350,93		412,30
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	2274,70	1176,10	1490,54	976,91	753,02	45,26
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	1306,76	2269,95	2187,61	344,78	480,47	243,11

Tabla 20. Expresión media de GUS en plantas de soja transformadas de generación R₀ en Embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla, Semilla inmadura R3, Vaina R3 y Cotiledón R5.

Descripción de EXP	Descripción de UTR 3'	Embrión de vaina amarilla	Cotiledón de vaina amarilla	Semilla inmadura R3	Vaina R3	Cotiledón R5
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	104,58	115,16	340,02	859,14	64,18
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	1582,51	832,99	84,88	1157,18	247,75
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	961,14	1050,82	456,55	2455,53	861,1
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	47,86	49,45	67,45	433,54	101,34
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	126,53	334,27			59,33
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	100,42	181,62	209,92	467,72	190,51

5 Como se demuestra en las Tablas 19 y 20, los 3' UTR de *Medicago* T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID NO: 26) y T-Mt.AC140914v20-1:2:1 (SEQ ID NO: 2) afectaron a la expresión del elemento de EXP constitutivo EXP-DaMV.FLT:1:2 (SEQ ID NO: 51) de forma diferente al 3' UTR derivado de *Gossypium barbadense* T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40). En muchos de los tejidos muestreados, hubo una potenciación de la expresión usando los 3' UTR de *Medicago*. Con respecto al 3' UTR T-Mt.AC140914v20-1:2:1, se observó potenciación en la mayoría de los tejidos en plantas que también comprendían el elemento de EXP EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42). Las Tablas 21 y 22 muestran las diferencias en número de veces de la expresión de GUS cuantitativa con respecto a la expresión transmitida por pMON121042 (T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40)), que comprendía un 3' UTR derivado de *Gossypium barbadense*.

Tabla 21. Diferencias de expresión en número de veces en plantas de soja transformadas de generación R₁ en Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Peciolo R1 y Flor R1.

Descripción de EXP	Descripción de UTR 3'	Raíz Vn5	Hoja Sumidero Vn5	Hoja Fuente Vn5	Hoja Fuente R1	Peciolo R1	Flor R1
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	6,13	1,47	2,37	1,14	3,76	2,99
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	4,86	1,05	2,17	5,72	12,62	1,58
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	5,67	2,13	2,46	2,78		0,11
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	3,26	4,12	3,61	0,98		0,59

Tabla 22. Diferencias de expresión en número de veces en plantas de soja transformadas de generación R₁ en Embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla, Semilla inmadura R3, Vaina R3 y Cotiledón R5.

Descripción de EXP	Descripción de UTR 3'	Embrión de vaina amarilla	Cotiledón de vaina amarilla	Semilla inmadura R3	Vaina R3	Cotiledón R5
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	15,13	7,23	0,25	1,35	3,86
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	9,19	9,13	1,34	2,86	13,42
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	2,64	6,76			0,59

(continuación)

Descripción de EXP	Descripción de UTR 3'	Embrión de vaina amarilla	Cotiledón de vaina amarilla	Semilla inmadura R3	Vaina R3	Cotiledón R5
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2,10	3,67	3,11	1,08	1,88

Los experimentos anteriores demuestran que cada uno de los 3' UTR de *Medicago* tiene diferentes efectos sobre el nivel de expresión de cada uno de los elementos de EXP constitutivos con respecto a pMON121042 (T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40)), que comprende el UTR 3' derivado de *Gossypium barbadense*. Por ejemplo, la expresión de EXP-DaMV.FLT:1:2 se potenció de 1,14 a 15,13 veces en Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Pecíolo R1, Flor R1, Embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla, Vaina R3 y Cotiledón R5, pero se redujo en la Semilla inmadura R3 usando T-Mt.Sali3-2-1:2:1. Este mismo elemento de EXP, cuando se combinó con T-Mt.AC140914v20-1:2:1, dio como resultado una potenciación de 1,34 a 13,42 veces en Raíz Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Pecíolo R1, Flor R1, Embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla, Semilla inmadura R3, Vaina R3 y Cotiledón R5, pero permaneció aproximadamente igual a T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40) en la Hoja sumidero V5. La expresión en Embrión de vaina amarilla fue aproximadamente dos veces la del Cotiledón de vaina amarilla usando T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (potenciación de 15,13 frente a 7,23 veces), mientras que la expresión en estos dos tejidos fue relativamente igual cuando se usó T-Mt.AC140914v20-1:2:1 (potenciación de 9,19 frente a 9,13 veces). Con respecto al elemento de EXP EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3, la combinación con T-Mt.AC140914v20-1:2:1 produjo menos potenciación en muchos de los tejidos muestreados que cuando este mismo UTR 3' se combinó con EXP-DaMV.FLT: 1:2. En Flor R1, hubo una reducción de la expresión con respecto a T-Gb.E6-3b:1:1 cuando EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 se combinó con T-Mt.AC140914v20-1:2:1. La combinación de EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 con T-Mt.Sali3-2-1:2:1 proporcionó potenciación en Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Embrión de vaina amarilla y Cotiledón de vaina amarilla, pero redujo la expresión en la Flor R1 y el Cotiledón R5 con respecto a T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40).

Cada uno de los dos 3' UTR de *Medicago*, T-Mt.Sali3-2-1:2:1 y T-Mt.AC140914v20-1:2:1, afectó a la expresión de los dos elementos de EXP constitutivos diferentes, EXP-DaMV.FLT:1:2 y EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3, de manera diferente. En muchos tejidos, hubo una potenciación de la expresión con respecto a T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40), pero en algunos tejidos, se produjo una reducción de la expresión. Por tanto, mediante el uso de diferentes 3' UTR de *Medicago*, se puede controlar más precisamente la expresión en la planta y realizar mejor el "ajuste fino" de la expresión de moléculas de ADN transcribibles para proporcionar una expresión óptima cuando se requiere la expresión de la molécula de ADN transcribible, reduciendo al mismo tiempo la expresión en tejidos que puedan afectar negativamente a la planta.

Ejemplo 6

El 3' UTR de *Medicago truncatula* T-Mt.AC145767v28-1:1:2 provoca la potenciación de la expresión de GUS cuando se combina con muchos elementos de EXP diferentes en plantas de soja transformadas establemente

Se transformaron plantas de soja con vectores, específicamente construcciones plasmídicas, para evaluar el efecto del 3' UTR de *Medicago* T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) sobre la expresión. Específicamente, las plantas de soja se transformaron con vectores que contenían varios EXP diferentes con un perfil de expresión constitutiva que impulsaban la expresión del transgén de β -glucuronidasa (GUS) unido operativamente al 3' UTR de *Medicago* T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1). Estas plantas de soja transformadas con 3' UTR de *Medicago* se compararon con plantas de soja transformadas en las que el transgén de GUS estaba unido operativamente a un UTR 3' derivado de *Gossypium barbadense*.

Los vectores utilizados en estos experimentos se construyeron usando procedimientos de clonación conocidos en la técnica. Los vectores resultantes comprendían una región del borde derecho de *A. tumefaciens*; un primer casete de expresión del transgén para la selección de células vegetales transformadas que transmite resistencia al antibiótico espectinomomicina (impulsada por el promotor de Actina 7 de *Arabidopsis*); un segundo casete de expresión del transgén utilizado para evaluar la actividad del UTR 3' T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) que comprende los elementos de EXP, EXP-Mt.AC145767v28-1:1:1 (SEQ ID NO: 35), EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42), EXP-BSAcVNV.FLT: 1:2 (SEQ ID NO: 52), EXP-CERV.FLT:1:2 (SEQ ID NO: 53), EXP-DaMV.FLT:1:2 (SEQ ID NO: 51), EXP-CUCme.eEF1a:1:1 (SEQ ID NO: 54) o EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31) unidos operativamente en 5' a una secuencia codificante para GUS que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 44) que está unido operativamente en 5' al UTR 3' T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) derivado de *Medicago truncatula*, o a los 3'UTR T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40) o T-Gb.FbL2-1:1:1 (SEQ ID NO: 41) derivados de *Gossypium barbadense*; y una región del borde derecho de *A. tumefaciens*. Los vectores que comprendían T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) eran pMON118798, pMON116815, pMON118769, pMON153709, pMON118771, pMON153707 y pMON155502. De forma notable, el vector pMON118798 comprendía el EXP-Mt.AC145767v28-1:1:1 que está compuesto de un elemento promotor unido operativamente a un elemento líder clonado a partir del mismo locus génico que el UTR 3' T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1). Los vectores que comprendían el 3'UTR de *Gossypium barbadense* eran pMON102167, pMON113874, pMON121030, pMON121042, pMON140827 y pMON125841.

La Tabla 23 proporciona las construcciones plasmídicas con el elemento de EXP, el UTR 3' y la SEQ ID NO utilizadas para transformar las plantas de soja que se presentan en este Ejemplo.

Tabla 23. Construcciones plasmídicas utilizadas para transformar plantas de soja y el elemento de EXP y el UTR 3' correspondientes.

Construcción plasmídica	Descripción de EXP	EXP SEQ ID NO:	Descripción de UTR 3'	UTR 3' SEQ ID NO:
pMON118798	EXP-Mt.AC145767v28:1:1	35	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON102167	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON116815	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON113874	EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	52	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON118769	EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	52	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON121030	EXP-CERV.FLT: 1:2	53	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON153709	EXP-CERV.FLT: 1:2	53	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON121042	EXP-DaMV.FLT: 1:2	51	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON118771	EXP-DaMV.FLT: 1:2	51	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	54	T-Gb.FbL2-1:1:1	41
pMON153707	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	54	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON125841	EXP-Mt.Ubq2:1:2	31	T-Gb.FbL2-1:1:1	41
pMON155502	EXP-Mt.Ubq2:1:2	31	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1

- 5 Las plantas de soja se transformaron y GUS se sometió a ensayo como se describe en el Ejemplo 3. Las Tablas 24 y 25 proporcionan los valores medios de GUS cuantitativos para la generación R₀ de plantas de soja transformadas establemente. Las células de la Tabla marcadas como "bdl" indican tejidos que se analizaron cuantitativamente pero en los que la expresión estaba por debajo del nivel de detección. Las Tablas 26 y 27 proporcionan los cambios en número de veces en la expresión de cada elemento de EXP unido operativamente a T-Mt.AC145767v28-1:1:2 con respecto a T-Gb.E6-3b:1:1(SEQ ID NO: 40).
- 10

Tabla 24. Expresión media de GUS en plantas de soja transformadas de generación R₀ en Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Pecíolo R1 y Flor R1.

Descripción de EXP	Descripción de UTR 3'	Raíz Vn5	Raíz R1	Hoja sumidero Vn5	Hoja fuente Vn5	Hoja fuente R1	Pecíolo R1	Flor R1
EXP-Mt.AC145767v28-1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	59,00	71,00	32,00	34,00	33,00	23,00	bdl
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	400,90	618,03	551,61	605,29	350,93		412,30
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	3817,28		1939,40	3250,38	1393,65	1001,37	876,08
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	111,12		19,96	19,46	17,47	88,14	64,38
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	6514,58	1081,72	477,98	419,52	227,72	1380,90	581,97
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	378,02		344,15	480,25	177,64	285,15	130,87
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	6711,26		1618,72	3262,73	2995,09	5071,90	3608,75
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	760,79		688,93	509,35	320,02	379,69	467,94
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	9322,50	3655,79	5870,15	3923,47	2313,08	3610,84	2131,16
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Gb.FbL2-1:1:1	189,24	153,52	59,60	37,44	103,01	130,60	130,38
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	2300,06		160,99	216,21	744,44	1628,65	405,97
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Gb.FbL2-1:1:1	800,93		202,73	275,48	143,60	1195,97	482,13
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	855,00		293,68	1118,76	254,25	875,67	398,10

Tabla 25. Expresión media de GUS en plantas de soja transformadas de generación R₀ en Embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla, Semilla inmadura R3, Vaina R3 y Cotiledón R5.

Descripción de EXP	Descripción de UTR 3'	Embrión de vaina amarilla	Cotiledón de vaina amarilla	Semilla inmadura R3	Vaina R3	Cotiledón R5
EXP-Mt.AC145767v28:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	31,00	27,00	bdl	bdl	26,00
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	47,86	49,45	67,45	433,54	101,34
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	358,03	1192,69	989,47	2309,72	566,93
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	28,31	62,63	24,08	115,00	11,35
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	547,47	207,69	128,15	927,48	65,67
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	68,57	70,12	64,42	264,62	34,43
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1474,35	4242,09	2441,01	7209,69	900,82
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	104,58	115,16	340,02	859,14	64,18
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	2806,65	1814,87	518,90	3720,59	401,66
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Gb.FbL2-1:1:1	200,28	291,26	58,21	131,17	114,29
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1029,69	1883,48	209,77	1122,51	521,64
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Gb.FbL2-1:1:1	129,84	83,45	400,15	875,75	72,66
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2			247,18	1324,98	352,81

Tabla 26. Diferencias de expresión en número de veces en plantas de soja transformadas de generación R₁ en Raíz Vn5, Hoja sumidero Vn5, Hoja fuente Vn5, Hoja fuente R1, Pecíolo R1 y Flor R1.

Descripción de EXP	Descripción de UTR 3'	Raíz Vn5	Hoja Sumidero Vn5	Hoja Fuente Vn5	Hoja Fuente R1	Pecíolo R1	Flor R1
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	9,52	3,52	5,37	3,97		2,12
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	58,63	23,94	21,56	13,03	15,67	9,04
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	17,75	4,70	6,79	16,86	17,79	27,57
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	11,94	8,52	7,70	7,23	9,51	4,55
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Gb.FbL2-1:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	12,15	2,70	5,77	7,23	12,47	3,11
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Gb.FbL2-1:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

(continuación)

Descripción de EXP	Descripción de UTR 3'	Raíz Vn5	Hoja Sumidero Vn5	Hoja Fuente Vn5	Hoja Fuente R1	Peciolo R1	Flor R1
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1,07	1,45	4,06	1,77	0,73	0,83

Tabla 27. Diferencias de expresión en número de veces en plantas de soja transformadas de generación R₁ en Embrión de vaina amarilla, Cotiledón de vaina amarilla, Semilla inmadura R₃, Vaina R₃ y Cotiledón R₅.

Descripción de EXP	Descripción de UTR 3'	Embrión de vaina amarilla	Cotiledón de vaina amarilla	Semilla inmadura R ₃	Vaina R ₃	Cotiledón R ₅
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	7,48	24,12	14,67	5,33	5,59
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	19,34	3,32	5,32	8,07	5,78
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	21,50	60,50	37,89	27,25	26,16
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	26,84	15,76	1,53	4,33	6,26
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Gb.FbL2-1:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	5,14	6,47	3,60	8,56	4,56
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Gb.FbL2-1:1:1			1,00	1,00	1,00
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2			0,62	1,51	4,86

5 Como se demuestra en las Tablas 24 y 25, el 3' UTR de *Medicago* T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) impulsó la expresión de los seis elementos de EXP constitutivos con respecto a T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40), pero de diferentes maneras dependiendo del elemento de EXP y el tejido específicos. El elemento de EXP, EXP-Mt.AC145767v28-1:1:1, cuando se usó para impulsar GUS y estaba unido operativamente a su UTR 3' T-Mt.AC145767v28-1:1:2 nativo se expresó muy poco en todos los tejidos sometidos a ensayo y fue detectable en Semilla inmadura R₃, Vaina R₃ y Flor R₁. Algunos tejidos de plantas que comprendían el elemento de EXP EXP-Mt.Ubq2:1:2 y the UTR 3' T-Mt.AC145767v28-1:1:2 demostraron una expresión relativa reducida con respecto a la combinación de EXP-Mt.Ubq2:1:2 y T-Gb.FbL2-1:1:1. Esta expresión reducida se observó en Semilla inmadura R₃, Flor R₁ y Peciolo R₁ mientras que, por el contrario, la expresión en Hoja sumidero Vn₅ y Cotiledón R₅ se potenció más de cuatro veces. No hubo cambio en la expresión en la raíz (Raíz Vn₅) con EXP-Mt.Ubq2:1:2 y ningún UTR 3'.

15 El grupo de elementos de expresión reguladores EXP-CERV.FLT:1:2 y EXP-DaMV.FLT:1:2 proporcionó los mayores niveles de expresión. Como se demuestra en las Tablas 26 y 27, estos dos EXP se potenciaron en todos los tejidos con T-Mt.AC145767v28-1:1:2 con respecto a los mismos EXP combinados con T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40). El grupo de elementos de expresión reguladores EXP-CERV.FLT:1:2 se potenció 60,50 veces en el Cotiledón de vaina amarilla en desarrollo y menos en el Embrión de vaina amarilla (21,50 veces), mientras que el grupo de elementos de expresión reguladores EXP-DaMV.FLT:1:2 se potenció en mayor grado en el Embrión de vaina amarilla que en el Cotiledón de vaina amarilla (potenciación de 26,80 frente a 15,76 veces, respectivamente). Estas diferencias de expresión y potenciación ofrecen una oportunidad para proporcionar una expresión personalizada de un transgén en la semilla en desarrollo de etapa más tardía. El grupo de elementos de expresión reguladores EXP-BSAcVNV.FLT:1:2 se expresó mucho más en la Vaina R₃ y la Raíz Vn₅ cuando se combinó con T-Gb.E6-3b:1:1 (see Tablas 25 y 26). La expresión de EXP-BSAcVNV.FLT:1:2 en estos dos tejidos se potenció drásticamente cuando se combinó con T-Mt.AC145767v28-1:1:2, particularmente en Raíz Vn₅. Adicionalmente, la expresión de EXP-BSAcVNV.FLT:1:2 se estimuló 58,63 veces cuando se combinó con T-Mt.AC145767v28-1:1:2 con respecto a este mismo EXP combinado con T-Gb.E6-3b:1:19 (SEQ ID NO: 40)

En resumen, el UTR 3' de *Medicago truncatula* T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) potenció la expresión de seis

elementos de EXP constitutivos diferentes que derivaron de ADN genómico de plantas y de virus de plantas. Además, este UTR 3' potenció la expresión del elemento de EXP preferido en semillas EXP-Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID NO: 54) con respecto a la mayoría de las otras UTR 3' derivadas de *Medicago*. En consecuencia, este UTR 3' es adecuado para proporcionar una expresión potenciada de un promotor o combinación de elementos de expresión unidos operativamente en una construcción.

Ejemplo 7

Análisis de EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31) en plantas de soja transformadas establemente

Se transformaron plantas de soja con vectores, específicamente construcciones plasmídicas, que comprendían el grupo de elementos de expresión reguladores constitutivo EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31) unido operativamente a una secuencia codificante de GUS. Estas plantas transformadas después se sometieron a ensayo para determinar la expresión de GUS en plantas de soja transformadas establemente.

Los vectores de plantas utilizados en estos experimentos se construyeron usando procedimientos de clonación conocidos en la técnica. Los vectores resultantes comprendían una región del borde derecho de *A. tumefaciens*; un primer casete de expresión del transgén para la selección de células vegetales transformadas que transmite resistencia al antibiótico espectinomocina (impulsada por el promotor de Actina 7 de *Arabidopsis*); un segundo casete de expresión del transgén utilizado para evaluar la actividad de EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31) que comprendía EXP-Mt.Ubq2:1:2 unido operativamente en 5' a una secuencia codificante para β-glucuronidasa (GUS) que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 44) unido operativamente en 5' al UTR 3' T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) derivado de *Medicago truncatula*, o las UTR 3' T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40) o T-Gb.FbL2-1:1:1 (SEQ ID NO: 41) derivadas de *Gossypium barbadense*; y una región del borde derecho de *A. tumefaciens*.

Los vectores resultantes se usaron para transformar plantas de soja como se describe en el Ejemplo 3. La Tablas 28 y 29 muestran los valores promedio cuantitativos de expresión de GUS sometidos a ensayo en diversos tejidos y puntos temporales de desarrollo para las plantas de soja transformadas establemente.

Tabla 28. Expresión de GUS promedio en hoja, raíz y flor para plantas de soja transformadas establemente que comprendían EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31).

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	Raíz Vn5	Hoja sumidero Vn5	Hoja Fuente Vn5	Hoja Fuente R1	Pecíolo R1	Flor R1
pMON125840	T-Gb.E6-3b:1:1	252,58	126,69	86,01	49,05	108,41	83,23
pMON125841	T-Gb.FbL2-1:1:1	800,93	202,73	275,48	143,6	1195,97	482,13
pMON155502	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	855	293,68	1118,76	254,25	875,67	398,1

Tabla 29. Expresión de GUS promedio en tejidos de vaina y semilla para plantas de soja transformadas establemente que comprendían EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31).

Construcción plasmídica	Descripción de UTR 3'	Semilla inmadura R3	Vaina R3	Cotiledón R5	Embrión de vaina amarilla	Cotiledón de vaina amarilla
pMON125840	T-Gb.E6-3b:1:1	2,22	111,19	3,21	24,31	50,98
pMON125841	T-Gb.FbL2-1:1:1	400,15	875,75	72,66	129,84	83,45
pMON155502	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	247,18	1324,98	352,81		

Como se demuestra en las Tablas 28 y 29, EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31) es capaz de impulsar la expresión constitutiva de una molécula de ADN transcribible en plantas de soja transformadas establemente. Adicionalmente, diferentes UTR 3' afectan al grado de expresión en cada tejido. Por ejemplo, la combinación de EXP-Mt.Ubq2:1:2 con T-Gb.E6-3b:1:1 dio como resultado una expresión menor en todos los tejidos sometidos a ensayo que los otros dos UTR 3', T-Gb.FbL2-1:1:1 y T-Mt.AC145767v28-1:1:2. Sin embargo, independientemente de qué UTR 3' se aplicó, EXP-Mt.Ubq2:1:2 proporciona una expresión constitutiva de media a alta, cuyo grado puede modularse mediante una selección de qué UTR 3' está unido operativamente al EXP.

Ejemplo 8

Potenciadores derivados de los elementos reguladores

Los potenciadores pueden derivar de los elementos promotores proporcionados en el presente documento, tales como la SEQ ID NO: 32 y 36. Un elemento potenciador puede comprender uno o más elementos reguladores cis que, cuando se unen operativamente en el 5' o 3' a un elemento promotor, o se unen operativamente en el 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están unidos operativamente a un promotor, pueden potenciar o modular la expresión

de una molécula de ADN transcribible, o proporcionar la expresión de una molécula de ADN transcribible en un tipo de célula u órgano vegetal específico o en un momento particular en el desarrollo o ritmo circadiano. Los potenciadores se fabrican retirando la secuencia TATA o elementos funcionalmente equivalentes, y cualquier secuencia corriente abajo que permita el inicio de la transcripción desde los promotores o fragmento de promoción.

- 5 Los elementos potenciadores pueden proceder de los elementos promotores proporcionados en el presente documento y clonarse utilizando procedimientos conocidos en la materia para estar unidos operativamente en el 5' o 3' a un elemento promotor, o unidos operativamente en el 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están unidos operativamente a un promotor. Como alternativa, los elementos potenciadores pueden clonarse, usando procedimientos conocidos en la técnica, para estar unidos operativamente a una o más copias del elemento potenciador que están unidos operativamente en el 5' o 3' a un elemento promotor, o unidos operativamente en el 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están unidos operativamente a un promotor. Adicionalmente, los elementos potenciadores pueden clonarse para que se unan operativamente en el 5' o 3' a un elemento promotor procedente de un organismo de género diferente, o se unan operativamente en el 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales procedentes de organismos de otro género o del organismo del mismo género que se unen operativamente a un promotor procedente del organismo del mismo o diferente género, dando como resultado un elemento regulador quimérico. Un vector de transformación de plantas de expresión de GUS puede construirse utilizando procedimientos conocidos en la materia similares a las construcciones descritos en los Ejemplos previos en los que los vectores de expresión de plantas resultantes contienen una región del borde izquierdo de *A. tumefaciens*; un primer casete de selección del transgén que confiere resistencia a un antibiótico o herbicida y se utiliza para la selección de células vegetales transformadas; y un segundo casete de transgén en el que un elemento potenciador se une operativamente a un promotor que forma un elemento promotor quimérico, que se une operativamente en 5' a un elemento líder, que se une operativamente en 5' a una secuencia codificante para GUS que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 44), unido operativamente a un UTR 3' tal como T-Gb.E6-3b:1:1 o cualquiera de los descritos anteriormente de *Medicago truncatula*; y una región del borde derecho de *A. tumefaciens*.
- 25 La expresión de GUS impulsada por un elemento regulador que comprende uno o más potenciadores puede evaluarse en ensayos de plantas estables o transitorios como se describen en el presente documento para determinar los efectos del elemento potenciador sobre la expresión de una molécula de ADN transcribible. Las modificaciones a uno o más elementos potenciadores o la duplicación de uno o más elementos potenciadores pueden realizarse basándose en la experimentación empírica y la regulación de la expresión génica resultante que se observa utilizando cada composición de elementos reguladores. Alterar las posiciones relativas de uno o más potenciadores en los elementos regulador o regulador quimérico resultantes puede alterar la actividad o especificidad transcripcional del elemento regulador o regulador quimérico y se determina empíricamente para identificar los mejores potenciadores para el perfil de expresión transgénico deseado dentro de la planta de maíz u otro género de planta.

Ejemplo 9

35 **Análisis del efecto de las UTR 3' sobre la expresión de GUS constitutiva en plantas de maíz transformadas establemente**

Se transformaron plantas de maíz con construcciones plasmídicas binarias para evaluar el efecto de la UTR 3' de *Medicago* T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17) sobre la expresión con respecto a dos UTR 3' utilizados con frecuencia en plantas de maíz. Específicamente, las plantas de maíz se transformaron con n vectores que contenían un EXP que presentaba un perfil de expresión constitutiva que impulsa la expresión del transgén de β -glucuronidasa (GUS), que estaba unido operativamente al UTR 3' de *Medicago* T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17). Estas plantas de maíz transformadas se compararon con plantas de maíz transformadas en las que GUS estaba unido operativamente al UTR 3' T-AGRtu.nos-1:1:13 (SEQ ID NO: 49) o el UTR 3' T-Os.LTP:1 (SEQ ID NO: 56).

45 Las construcciones plasmídicas binarias utilizadas en estos experimentos se construyeron usando procedimientos de clonación conocidos en la técnica. Los vectores resultantes contenían una región del borde derecho de *A. tumefaciens*; un primer casete de expresión para evaluar la secuencia de UTR 3' en la que un grupo de elementos de expresión reguladores constitutivo EXP-FMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Zm.DnaK:1:2 (SEQ ID NO: 56) está unido operativamente en 5' a una secuencia codificante para GUS que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 44), que está unido operativamente en 5' a uno de los siguientes tres UTR 3': T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17), T-AGRtu.nos-1:1:13 (SEQ ID NO: 49) o T-Os.LTP:1 (SEQ ID NO: 56); un segundo casete de expresión del transgén utilizado para la selección de las células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el promotor de Actina 1 del arroz); y una región del borde izquierdo de *A. tumefaciens*. Los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar plantas de maíz.

55 El análisis histoquímico de GUS se utilizó para el análisis de expresión cualitativa de plantas transformadas. Se incubaron secciones de tejido completo con solución de tinción GUS X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-glucurónido) (1 mg/ml) durante un período de tiempo apropiado, se aclararon y se inspeccionaron visualmente para determinar la coloración azul. La actividad GUS se determinó cualitativamente mediante inspección visual directa o inspección bajo un microscopio utilizando órganos y tejidos de plantas seleccionadas. Las plantas R₀ se inspeccionaron para determinar su expresión en las raíces y hojas, así como en la antera, el estigma y las semillas y embriones en desarrollo, 21 días después de la polinización (21 DAP, por sus siglas en inglés).

También se realizó un análisis cuantitativo para las plantas de maíz transformadas. Para el análisis cuantitativo, se extrajo la proteína total de tejidos seleccionados de las plantas de maíz transformadas. Se usó un microgramo de proteína total con el sustrato fluorógeno 4-metileumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) en un volumen de reacción total de 50 μ l. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), tiene fluorescencia máxima a pH elevado, cuando el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de una solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente. La fluorescencia se mide con excitación a 365 nm, emisión a 445 nm utilizando un Fluoromax-3 (Horiba; Kioto, Japón) con un lector Micromax, con una anchura de rendija configurada para una excitación de 2 nm y una emisión de 3 nm.

Table 30 muestra la expresión de GUS cuantitativa promedio medida que demuestra efectos diferentes de cada UTR 3' sobre el mismo EXP de expresión constitutivo.

Tabla 30. Expresión de GUS promedio en plantas de maíz transformadas con diferentes UTR 3'.

Etapa de desarrollo	Tejido	Construcción plasmídica		
		pMON128881 T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17)	pMON119693 T-Os.LTP:1 (SEQ ID NO: 56)	pMON132035 T-AGRtu.nos:13 (SEQ ID NO: 49)
V4	Hoja	205	232	222
	Raíz	126	134	44
V7	Hoja	277	534	293
	Raíz	nd	135	nd
VT	Hoja	314	429	194
	Raíz	198	1043	291
	Flor/ Antera	527	486	308
R1	Mazorca/Seda	169	1258	319
R3	Embrión 21DAP	179	72	101
	Endospermo 21DAP	516	207	243

Como se puede observar en la Tabla 30, cada UTR 3' tuvo un efecto diferente sobre la expresión constitutiva impulsada por MV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Zm.DnaK:1:2 (SEQ ID NO: 56). Por ejemplo, el UTR 3' T-Os.LTP:1 (SEQ ID NO: 56) pareció potenciar la expresión en la Raíz VT y Mazorca/Seda R1 con respecto a los otros dos UTR 3'. La UTR 3' T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17) pareció potenciar la expresión en la semilla R3, tanto en el endospermo 21DAP como en el Embrión 21DAP con respecto a T-AGRtu.nos:1:1:13 (SEQ ID NO: 49) y T-Os.LTP:1 (SEQ ID NO: 56). La expresión en la Flor/Antera también fue mayor usando T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17) con respecto a los otros dos UTR 3'. Las diferencias en la expresión observadas para cada una de las UTR 3' demuestran la utilidad de cada UTR 3' en la modulación de la expresión. Por tanto, estos experimentos demuestran que la selección de un UTR 3' puede usarse en casetes de transgén para realizar un ajuste fino de la expresión de una molécula de ADN transcribible particular. Este experimento también demuestra la capacidad de un UTR 3' derivado de dicotiledónea, tal como T-Mt.Oxr-1:2:1, para afectar a la transcripción en una especie monocotiledónea tal como el maíz.

Ejemplo 10

Análisis de la potenciación intrónica de la actividad de GUS usando protoplastos derivados de plantas

En general, Se selecciona un intrón basándose en la experimentación y la comparación con un control de vector sin intrón para seleccionar empíricamente un intrón y una configuración dentro de la disposición de elementos de ADN de transferencia de vectores (ADN-T) para la expresión óptima de un transgén. Por ejemplo, en la expresión de un gen de resistencia a herbicida, tal como CP4 (documento US RE39247), que transmite tolerancia a glifosato, es deseable tener una expresión de transgén dentro de los tejidos reproductivos, así como los tejidos vegetativos para evitar la pérdida de rendimiento al aplicar el herbicida. Un intrón en este caso se seleccionaría por su capacidad, cuando esté unido operativamente a un promotor constitutivo, para potenciar la expresión del transgén que confiere resistencia a los herbicidas, particularmente dentro de las células y tejidos reproductivos de la planta transgénica y, por tanto, proporcionar tolerancia tanto vegetativa como reproductiva a la planta transgénica cuando se pulveriza con el herbicida. En la mayoría de los genes de ubiquitina, la 5' UTR está compuesta por un líder, que tiene una secuencia de intrones incrustada en ella. Por tanto, los elementos reguladores procedentes de dichos genes se analizan utilizando la 5' UTR completa que comprende el promotor, líder e intrón. Para lograr diferentes perfiles de expresión o para modular el nivel de expresión transgénica, el intrón de dicho elemento regulador puede eliminarse o sustituirse por un intrón heterólogo.

El intrón presentado en el presente documento como la SEQ ID NO: 34 se identificó usando contigs de ADN genómico en comparación con las agrupaciones de marcadores de secuencia expresados, o contigs de ANDc, para identificar

secuencias exónicas e intrónicas dentro del ADN genómico. Además, también se usaron secuencias 5' UTR o líder para definir la unión de corte y empalme de intrón/exón de uno o más intrones en condiciones en las que la secuencia del gen codifica una secuencia líder que está interrumpida por uno o más intrones. Los intrones se clonaron usando procedimientos conocidos en la materia en un vector de transformación de plantas para estar unido operativamente en el 3' a un elemento regulador y fragmento líder y unido operativamente en 5' a un segundo fragmento líder o a secuencias codificantes, tales como los casetes de expresión presentados en la FIG. 1.

Por tanto, por ejemplo, un primer casetes de expresión posible, tal como la Configuración de Casete de Expresión 1 en la FIG. 1, está compuesto por un elemento promotor o promotor quimérico [A], unido operativamente en 5' a un elemento líder [B], unido operativamente en 5' a un elemento intrónico de control [C], unido operativamente a una región codificante [D], que está unido operativamente a un elemento UTR 3' [E]. Como alternativa, un segundo casete de expresión posible, tal como la Configuración de Casete de Expresión 2 en la FIG. 1, está compuesta por un elemento promotor o promotor quimérico [F], unido operativamente en 5' a un primer elemento líder o primer fragmento del elemento líder [G], unido operativamente en 5' a un elemento intrónico de control [H], unido operativamente en 5' a un segundo elemento líder o primer fragmento del segundo elemento líder [I], unido operativamente a una región codificante [J], que está unido operativamente a un elemento UTR 3' [K]. Adicionalmente, un tercer casete de expresión posible, tal como la Configuración de Casete de Expresión 3 en la FIG. 1, está compuesto por un elemento promotor o promotor quimérico [L], unido operativamente en 5' a un elemento líder [M], unido operativamente en 5' a un primer fragmento del elemento de secuencia codificante [N], unido operativamente en 5' a un elemento intrónico [O], unido operativamente en 5' a un segundo fragmento del elemento de secuencia codificante [P], que está unido operativamente a un elemento UTR 3' [Q]. De forma notable, La Configuración de Casete de Expresión 3 está diseñada para permitir el empalme del intrón de manera que produzca un marco de lectura abierto completo sin un cambio de marco entre el primer y el segundo fragmento de la secuencia codificante.

Como se analiza en el presente documento, puede ser preferible evitar utilizar la secuencia de nucleótidos AT o el nucleótido A justo antes del extremo 5' del sitio de corte y empalme (GT) y el nucleótido G o la secuencia de nucleótidos TG, respectivamente justo después del extremo 3' del sitio de corte y empalme (AG) para eliminar la posibilidad de que se formen codones de inicio no deseados durante el procesamiento del ARN mensajero en la transcripción final. La secuencia de ADN alrededor de los sitios de unión de corte y empalme del extremo 5' o 3' del intrón se puede modificar así.

Los intrones se someten a ensayo para determinar un efecto de mejora a través de la capacidad de mejorar la expresión en un ensayo transitorio o un ensayo de plantas estable. Para el ensayo transitorio de la potenciación del intrón, se construye un vector de planta base usando procedimientos conocidos en la materia. El intrón se clona en un vector de planta base que comprende un casete de expresión compuesto por un EXP constitutivo compuesto por un promotor y líder tal como EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42), unido operativamente en 5' a un elemento intrónico de ensayo (por ejemplo, una SEQ ID NO: 34), unida operativamente a una secuencia codificante de GUS que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 44), unido operativamente al UTR 3' de (T-Gb.E6-3b:1:1, SEQ ID NO: 40). Las células de protoplastos procedentes del tejido vegetal de soja u otro género pueden transformarse con el vector de planta base y los vectores de control de luciferasa como se describió anteriormente en el Ejemplo 2 anterior, y se ensayaron para determinar su actividad. Para comparar la capacidad relativa del intrón para mejorar la expresión, los valores de GUS se expresan como una relación de actividad de GUS a luciferasa y se comparan con los niveles impartidos por una construcción que comprende el promotor constitutivo unido operativamente a un patrón de intrón conocido, tal como el intrón derivado del gen 4A10 del factor de elongación de *Nicotiana tabacum*, I-Nt.eIF4A10-1:1:1 (SEQ ID NO: 57), así como una construcción que comprende el promotor constitutivo, pero sin un intrón unido operativamente al promotor.

Para el ensayo de plantas estable del intrón presentado como la SEQ ID NO: 34, un vector de transformación de plantas de expresión de GUS puede construirse de manera similar a las construcciones descritas en los ejemplos previos en los que los vectores de expresión de plantas resultantes contienen una región del borde derecho de *A. tumefaciens*; un primer casete de expresión puesto por un EXP constitutivo compuesto por un promotor y líder tal como EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42), unido operativamente en 5' a un elemento intrónico de ensayo (por ejemplo, SEQ ID NO: 34), unido operativamente a una secuencia codificante para GUS que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 44), unido operativamente a la UTR 3' de *Gossypium barbadense* (T-Gb.E6-3b:1:1, SEQ ID NO: 40). Pueden transformarse células de protoplastos de tejido de maíz u otros géneros de plantas con el vector de planta base y vectores de control de luciferasa, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2 anterior, y pueden someterse a ensayo para determinar su actividad. Para comparar la capacidad relativa del intrón para mejorar la expresión, los valores de GUS se expresan como una relación de actividad de GUS a luciferasa y se comparan con los niveles impartidos por una construcción que comprende el promotor constitutivo unido operativamente a un patrón de intrón conocido, tal como el intrón derivado del gen 4A10 del factor de elongación de *Nicotiana tabacum*, I-Nt.eIF4A10-1:1:1 (SEQ ID NO: 57), así como una construcción que comprende el promotor constitutivo, pero sin un intrón unido operativamente al promotor.

Ha de señalarse que el intrón presentado como la SEQ ID NO: 34 puede modificarse en un número de maneras, tal como suprimiendo fragmentos dentro de la secuencia de intrones, lo que puede reducir la expresión o la duplicación de fragmentos con el intrón que puede mejorar la expresión. Además, las secuencias de ADN dentro del intrón que pueden afectar la especificidad de la expresión a tipos de células o tejidos y órganos particulares pueden duplicarse o

alterarse o suprimirse para alterar la expresión y los patrones de expresión del transgén. Además, los intrones proporcionados en el presente documento se pueden modificar para retirar cualquier posible codón de inicio (ATG) que pueda hacer que los transcritos no intencionales se expresen a partir de intrones empalmados de forma indebida como proteínas diferentes, más largas o truncadas. Una vez que el intrón se ha sometido a ensayo empíricamente, o se ha alterado basándose en la experimentación, el intrón puede usarse para potenciar la expresión de un transgén en plantas transformadas de manera estable que pueden ser de cualquier género de planta monocotiledónea o dicotiledónea, siempre que el intrón proporcione una potenciación del transgén. El intrón también se puede usar para potenciar la expresión en otros organismos, tales como algas, hongos o células animales, a condición de que el intrón proporcione una potenciación o atenuación o especificidad de la expresión del transgén al que está unido operativamente.

<110> Monsanto Technology LLC

<120> ELEMENTOS REGULADORES DE PLANTAS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> MONS:332WO

<150> 61/785.268

<151> 14-03-2014

<160> 57

<210> 1

<211> 500

<212> ADN

<213> *Medicago truncatula*

<400> 1

```

ttaatcatct gaaactgttc accatgcatg caatcttgtg aaatatatgg tttaattag   60
acttcaatct tatgttggct attgtactaa taaaagcatg tcatgttatt ttcatttgat  120
tttatctgta ctttggtttg tttgaagaat aaagatgagc ttgctatgca tgcattgcatg  180
ccatcgatta tcagggtttc cttttttcct ttctggcttc ccatcaattt ggtgtgaatt  240
agtgtgtgtg atatattata ttatgctatt tatgaaataa attggttggtt atatttgatc  300
tacaatctac atacatgtga tttttatcaa caaatatct cgggaaacaa tacctttttg  360
gtagcaaaat tcaaataata ctatttttaa taaatcaaag ttaaccaata ccttattcaa  420
gttggagggg tctcaaacaa gcaaaagaat tcaagttggt aatgaacttc ggtaaatgat  480
aaaagaattc gcatttaaaa                                     500

```

<210> 2

<211> 500

<212> ADN

<213> *Medicago truncatula*

<400> 2

ES 2 741 223 T3

aagggctctc tgtcatgatt tcatactttc attattgagc tctgtaatta caattatgac 60
 catgagaaca tctcttattg tgtggccttt taattgctga tgttagtact gaaccaaagc 120
 ttatcgtgat gatgtaaaag caataagtac ttgtttgtag cttctttgtg tctccctttg 180
 ggcttaatac atctgtttag tgttgtggct ttggcataga cttctcttgg taataatgcc 240
 ttgcaatgca aaatttcaat tatcaaattc tattatgttc tcaccttatg gtaacagctt 300
 accctgtgga agatgagatt cttgagttga gtcattgcca atttttggca ttagcttttg 360
 aattagtga ttttgacaaa aattaccgtg aactgattt tgttgaagct cttaagtgta 420
 gtttttacia aatttcagtg gctcgtttgt attatgtcaa actcacggcg aatgtagttc 480
 ttacagaatt tcagtggctc 500

<210> 3
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

5

<400> 3

gcatgaataa tcaagctcat aaatttcatg gctttgaatt tgtactatth tggttactag 60
 aaagtgtatt tgtgtgttta tgcagtaata aatctctaag agatatatgt ttgttattht 120
 ttataattat ccaaaaaatc gttaatgttg aaaattgatt caaaattgat attgaagttc 180
 tgaaaaaatc gtggcgtgat taaaaatcca aactthttta taaaataata ttgtgtctat 240
 atctthttata aatgacgata aatgggataa agtaaataa acaaaaccgt taatgcaatg 300
 ttcactctgca caatatatat aattaaaaaa cattataaaa ccttgthttct tcaactatth 360
 acaatcttga aattthtagtc tttaccatth gaaagtacia tctthttcatg aaagthttata 420
 gtacaaatca agagthttgga taagctgctc tgctthttat aatcaactggg aatgattta 480
 tgacttgga aaacaacttg 500

<210> 4
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

10

<400> 4

ES 2 741 223 T3

aaaattggtg ttgaattcca aaagggctct gtagtagaaa tttacgtaca agcaaaatcg 60
 atttcttgat atacaagtta aagggatatat gagaaaatac atacatgtaa atgagtaccg 120
 agttttctat agtttgagca tttgtgtcaa ataagcaagt gattgtgatg attccaagct 180
 tttaaattga aaaaagatta gcaaccaaga atcaaacatc cacacacccat atacatgctc 240
 taggcttcaa ataccattga gcaacattat actctatatt gtttgatttc aaccaattcc 300
 aagagcttga taattcgcac gagaattata ttatatcaaa aacttttagtg aaagatgctc 360
 caataatttc taaacttggtg atcattttttt ggcattagga ataaggcaaa aatctgcaaa 420
 atgcaataag aaaaaactag ctcatgaata caaagaaaat gttactacaa ctgacatttt 480
 caaaattcaa caataatctt 500

<210> 5
 <211> 465
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

5

<400> 5

ggagcagtggt gtgggtggttg agaggaatgg tgcaccttac ataaatttca cagacattgc 60
 tcttattttg aatgcggggtt catcgacatt gggtagtttt tggatgtatt ttgctagaca 120
 cgatgaacgt ggagtttgat tgttttctct attggtgatc ctctgttaaa taacattggt 180
 aagtgataat tcccagctat ttcggtttta ttattcccca atggtgctct tccgcatgct 240
 ccaaagtagt ctttgaggtt ctctgtctgcg ttttaattgta ttggaagtaa attaacagca 300
 tcacgactct ttcgtaatta gttactttca aagaattttt ttggcactaa aactaccct 360
 gatggagtggt tcaattttaa acatgagaac ttataaaaga tttttaaaca tgagaactta 420
 tcaaaaatat tatgaatggt cgctcgatat gaagtaggca aggtt 465

<210> 6
 <211> 472
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

10

<400> 6

ES 2 741 223 T3

tctaacacca tggttacttc ataagttggt cctttttaat agtttggtat cttgtccgtg 60
 tcttagtttt ttgttattcc agttttatth ttccagtttt agaaacttac agaactgggt 120
 tcttgatcgg cgatggtacc gtttttggtt ttaattgta agagtcttga gaacttgaat 180
 ttcaaagggc agcttaaagg tttgacatct taattttgct gctgaggaat gttgtaattg 240
 cattttatth acaagacagt tttgttatgt caaatcttat atttatctth atggttatgt 300
 ttttgaatth ttgttcgtaa tatttgcct tgattgtgtg tttgtggttc cgtgcttgca 360
 attttacttg gaaagattgg ctttctgcag gttggtttta gcctgtttaa gctgtcatga 420
 catgtttgat tagtgaattc cagagaacat gcctaattca tgtgcagcag ca 472

<210> 7
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

5

<400> 7

aaataaaatt acttatagat agatttgga ctagatgact agtgttttat tgtttctggt 60
 ttgtgtaatt ctataaatta atgttatctc tatgtccaag aatgttatct ctagtgctct 120
 ttgttgact tggactgaaa ttatgggat tggatttatg tgcttttcat gactcgtcaa 180
 taaatgaata aataaaatgt gacttttctc ctttacttgt tgtgtttggc ttctgatgta 240
 ataagaaatc caatgaatct gctaataatc ttgtgagagt tttagtata taataaata 300
 cctaccgctt caaacatagt ttttgthttt aaaaaaaaaa aaaaaaaca gggaaagtat 360
 attaacaatc tcttagatth atcccagaat aattgaatth ttcactatth atgcttagta 420
 ctattaagta aagctagtga gaggggcatt ttatggctca tcactagagc atgtacaaaa 480
 gaaattgttc tcgtgaatth 500

<210> 8
 <211> 452
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

10

<400> 8

ES 2 741 223 T3

tgagtcaaag ttggtgtctc ttttgaagac tagaaaaagg gtttattttg ttgttatttt 60
 gagtattgtg gtttgacttg cgagacagaa taattgggtg gagttttatc tttttgtttt 120
 ctttttgttc ttttgataat ttcagggtca gtgtacttgg tccaacccga gcaaaagggg 180
 tattataaaa cactatttcg aagtgaagtt cttttttcaa tttgaaatta tgtggcttca 240
 tttacacatt agattctcat cctaaattaa tccgaaattg aatggtggtt taactaatgt 300
 cttgaaaatt gagagtattt tctccagtat tctatagggt ttcttccggt gaggcaaaat 360
 atatgtttat gtgcatcaaa cataaatgtg agtatcattc ttagtcggga ttaaatagga 420
 ctattgagtt tttgtgagca tagcttggtt gg 452

<210> 9
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

5

<400> 9

tgagtcaaag ttggtgtctc ttttgaagac tagaaaaagg gtttattttg ttgttatttt 60
 gagtattgtg gtttgacttg cgagacagaa taattgggtg gagttttatc tttttgtttt 120
 ctttttgttc ttttgataat ttcagggtca gtgtacttgg tccaacccga gcaaaagggg 180
 tattataaaa cactatttcg aagtgaagtt cttttttcaa tttgaaatta tgtggcttca 240
 tttacacatt agattctcat cctaaattaa tccgaaattg aatggtggtt taactaatgt 300
 cttgaaaatt gagagtattt tctccagtat tctatagggt ttcttccggt gaggcaaaat 360
 atatgtttat gtgcatcaaa cataaatgtg agtatcattc ttagtcggga ttaaatagga 420
 ctattgagtt tttgtgagca tagcttggtt ggcggagatt ttgctgtata taggggttaa 480
 ttcttggttg gaggagattt 500

<210> 10
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

10

<400> 10

gctgtttcat tactgtggta gtgctataaa ttggcctact ttttgtttct tacagtctat 60
 tagcctagca gccgttaggc ctctttttta aatgtaataa gttgaattcc tgaactcgtg 120
 aagcttgccc cttattgaac cgtagtggtt ttggttgctt aataccatta agcaatgagt 180

ES 2 741 223 T3

tgttttggat ttatatgcat ttaccgaatt ttatttggat gatagtaagc gttttttcca 240
 tgttcacaaa tatgccatga aaaaagcagt aaaatttcaa taaaccaaca tcatgataaa 300
 acaaaagtat gcatcgtatg aaaaaaagtg ggtgatgaaa tgataagtct aattttggtc 360
 gaatttggtc gttgttattt ttgcatgaac atctcttttg tacaacctaa caacttattt 420
 gctattttta atatttttgt actgcttttg atttgcttgc tcttcacaat attatagtgt 480
 tgcattagtt gttcaatttt 500

<210> 11
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

5

<400> 11

tatctcaata tctcaacttc aattcatttg ttgcagtgct ttgcattggt gtattatcag 60
 tgaacatatt tatttatata acatgttcgt tattgttgat gcgggttgat tatgctagag 120
 ctgaaactcg agcttgtact tatatatagt taccatatag ttacctatgt tgtatttgag 180
 tgttgttttag agattgcaag ttttgttggg tcttgtgttc tctgcaaatg aagagtaata 240
 ttttatgtag aataggtttg tgtgaattaa ttttttagaa tctggattta aactactgcg 300
 atcaattgat ttaagccctt ggatagagat cagttgactc acatcgtgac ctcgacaaat 360
 tgagtgtttt ttttcttctt tttcggatag aaaaatgtaa gttttgggaa gcagattttc 420
 tgctgtaaca gcagggtgct gtaaagcatc cgagctgtcc ggtcagaatt gtacggccat 480
 gatccgggtc tgctcaccaa 500

<210> 12
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

10

<400> 12

acacatattc aagctctatt actctgtttt tagggtgaga atattgtgaa gtgtgttgtg 60
 tgtgcgttct gttttatgta aaagtaaatt ctgtgaatta tttttgtaa ggaataaatt 120
 atgtaagaat ggtttaatta tctattgtct cacatcgttt tttatgtcta ttttaagtat 180
 tggattgta ttctatttat acacaagagt taataatagc ataacataaa ttccacaagg 240
 atcaagtaaa ataatatcca catgaaacat ctaagaaagg aaaacaatat ggctcaattt 300
 cctatctttc tttatttatg ttttagtcat ctttctttcc ctatttcttg ttgaaagcta 360
 ataggagtat ggtactttct acgccatttt tttttaagta ctctctttta cacaatattt 420
 tatcaaattg tagtgacatt ttattttaag atgcagttaa tgttcgttgt gttactgtca 480
 atgattgtcc aaaggtgaaa 500

<210> 13

ES 2 741 223 T3

aaaggttgaa ggaaagagaa tctcagcagt catattgaat ctgtttgatt tactacacaa 60
aaggataatt ttctatdddg gatgdddcaa taactgtgtg caatatdddag gtatdddagta 120
tgctctgtga gcaaattaat cccccctccc aaaatdddcat ttcacccccac tdddctgddd 180
ttccaaatgt ctctgtatcc gtggctctgc cacaatcttdt attgatattdg caatdddcca 240
gtdtdgtgca aataatcatg agcatttdcaa ttcactattdt tcaaatgdcg ctdtatacct 300
taaacacgag ggcatagctt cacactatgg ttdccatgaa tattgtcaca ccgtggttdg 360
caaggatatt gtdtdaaaggt taaatgtgac tgtgaatgat caatatdddg cagaaaagaa 420
ataaacttaa acaaaaggtg atctaaattdt tcaatgacca gtaatcaata tcttacaatc 480
tctcaactgt gaaattdcga 500

<210> 16
<211> 500
<212> ADN
<213> *Medicago truncatula*

5

<400> 16

tdtgcttdtat atatgataag aaattdgtdtdt ttdtagtdtdtg ctdtdccattdt gtaaaattdat 60
cttdtdgagag ttdtdtagattd attgdcacttdt ctaaattdtdc attdtdgcttdc ttdgtdtdgat 120
ctgggattdtc tgaaatgaac attagagtaa taaatdcgaat ctgagtdatta caagcaagtdt 180
tgtdgaaata atgatctcta attdtdgtcaa gtdtaaagaaa tcaaaatatac ttdgtaccacaaa 240
aaaaaaaaaa aatcaaaaaca tcatgtdtdtga ttaacaaaaac tccaattdtga aatcaattdta 300
aattdtaatt tcattdtdtdtag aaagaaaaaa aaaatattat tccatccatt attagtdtdtc 360
gatttdcacac aactagtdtdt tdcgatttdact cacgtaccta catatgagta tgtaagggtdt 420
gattacgtat tcattdattdgc tcttdtdgtdtdc acataattdct ttdtdtdtdcaa tcaaaatgaa 480
aattatataa aggagtdacaa 500

<210> 17
<211> 500
<212> ADN
<213> *Medicago truncatula*

10

<400> 17

ES 2 741 223 T3

aaatgaatga atcagctttc tcttgttcat aaagaattgt gtggaaatga attgtgtggt 60
 gctatataca tgagtgtggt gggtgctgcc ttatgtgttc ttctaggggtt attttttctt 120
 ttgcttttga ataatttgtg cgttactatt gtaaacaatg tattttaatga ataatgaaag 180
 tctaaagttt gtaatggagg gaagtaaag taaatccttt cgcaagtgtt tttttagctt 240
 gaaagtcttt catgcattgg tttggagtag catcatatca cccttaattt ttctagttat 300
 gatttttaggg acaagagaag ttcaaattac actccaatta tgtgctcggg gaaatttaat 360
 tggtagcaga caatacacga aaaagtaaca catttagtat ctactatca tctgcaaadc 420

 gtgcatatgt tcatatcatt tcacatTTTT ataatccagc atattataaa ttcaaaccta 480
 attttggtac ataatagtat 500

<210> 18
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*
 <400> 18

5

ttaatccatc atcatcggca tgtgtgtttg ttttttttgt gtctattttg accaaatcat 60
 atattcatat gtatgtgtaa attattatga actactgtat gttagtgtt catgttcgtg 120
 aactgaacac attgaatggt ctgtggagtg tggagattct ttcattgtt tatttattat 180
 gagtttttct tttttatttc ttcaaaagca gactactgaa atattgattt gataccacca 240
 aaaagaaaaa gtaatatatc ttactattaa tatttatagt tgatataaac atcatcaaaa 300
 tttaaaatca gtttctaadc ttggtttggt cgggggtggc cttggattcc attttgcata 360
 tgctgttgcc caggaactaa gctctttcat aagataatgt tcggggtagc tctgttacta 420
 ggtcataaaa aagaccgatt gttgtcatcg ttcgaaaaag cgaaaaaaca aacacaagca 480
 ttctcgtcat aacaaagacc 500

<210> 19
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*
 <400> 19

10

ES 2 741 223 T3

tgaagaagga taatgattga ttaattgttt aatataaagt tgaggggaatt tttttatatt 60
 ttctataaat tatcaaaata tgttgattgt tgagaataag aattctaggt tcaaaacaga 120
 atcttgaatt gtcaaggagt ctgttaaatg tgagatttat tattatgttt catttcaaaa 180
 gtattaagtt ttatttgtgt gactatttgg attgtgatta ttgctaaatg tttatacgta 240
 ttaaaatttg catgcttttt gtcccactca aataaaaatt aattagtatt gcttgcttcc 300
 aagttttaga tttactataa tatgtatttt ttttttttag agatacatgt aatatgtata 360
 aatattttgt aacgagcaaa aaaaatacac tctaattatc tcataataga gaaaagacac 420
 tctttatgtg agtgtaaatt cctataaaga aaagagatgt gaaaactacc ctcagtatac 480
 ggataattgc actcacaata 500

<210> 20
 <211> 289
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

5

<400> 20

gggtcttagt ttacttttct tgatttgtaa tgtacaatgg ggctgtggtg tttatatttc 60
 atttaatcgt taatgtacta ctttatacta gttgtttata tttaaaaaag cataaacttt 120
 gcctcatcta aatgtacttg aattgagttt acttagaagt gcttgaattg agtttgtgta 180
 aatgaacata attttagtag tgcttagatt aagttcacat atcactactt tataccaggg 240
 gattactatt ctttttagct tttgttttta ctgttggttt tttgccaaa 289

<210> 21
 <211> 382
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

10

<400> 21

gaagggctct gatctatgaa gcacggaaac gcctccgatt aggcgtgtcc aggtgtccga 60
 cacgtatcat ctctgatacc gacacgacac cgacacttac aattacacgg aattatgtaa 120
 ttttctcaaa ttattagagg tgtcggcgtg tcagtgtacg tgtcgtgtcc tttgtatccg 180
 tgtttcatag gtcttggttc attttcttg atttgtaatg tacaatgggg ttgttgtgtt 240
 taaatttcat ctaatcttta ctgtactatt ataaatatat atactagttt gttcataaaa 300
 gcataaagtt ttgcttatct ctttggtggt accggttcaa tgctcgacct aggaaaaaat 360
 taataaaatt tcattcataa aa 382

<210> 22
 <211> 400
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

15

<400> 22

ES 2 741 223 T3

gcaaggagga tcatgaacat cacaaagtga atttatntta tgnttgacc atatattatt 60
 atttgtgaca catttttagaa ctcttaaacc atntttctgt ttgcattnta gctactggnt 120
 gttgtattca caataatgat gcagtcctat gcttcttggnt gtaagattca atactatgta 180
 aagtgtatgt ctttggttgt atactatnta aaatctattc ttgtattgta taatttattt 240
 tagcctntgt ttgagattga ggnttacttgt tctgnttgcatt ttaatcacia gntttcattt 300
 tgttatatcgt acgtgntata cctgntntnt ggacctaaaa atactgggccc caatttcatt 360
 tcaaactntg tcaattatca aatttcaact gcacagnttca 400

<210> 23
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

5

<400> 23

actgcagntca cagntcataaa taccggntgca taacatgaat taattntnta tntgcaacat 60
 gntntntaaaa tcttaaacct tctatntntc cactccatag gnttatcaatt aagntattatt 120
 atnttntgtg attctactac tntggaatat aagaagntg aaaaggaatt tctgntgagccc 180
 ctatatataa accctaaacc ctatgntntat tgcctatntg taccactgnt actntgoggc 240
 tgtntgntaag atcaagnttat aantgctagg atagntntcta tntgntntcat gnttagntntc 300
 aaciaagntga tntcaattat gntgntntgaa cactntntaac tagntattgnt ttgntntgntt 360
 cacataatg atgntagnttct atgctntctg ntgcatgaac aaatactaca taaagntntaa 420
 gccctntggnt gntaantntat tnttagntaat atntactatt ntgntaantga tntntagcctt 480
 tntntgagat ntgagataaca ntgntntnttct tntcctntctc atntntatcac aantntntcat 540
 cntntntntac atntntgntnt ntatgaagagnt actaaaaata tctctagntta cntaaactntc 600
 cntntntgntat aagaaaaata ctatgntcag aaacataaat caagcatctg ntacgaacgnt 660
 tatactntgga aaaacaatat cantntntaac aactntntagnt 699

<210> 24
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

10

<400> 24

ES 2 741 223 T3

aaacaccaat tccatcttct tcaataataa ccactatata tatatagaag caacttcaaa 60
 aatacttaat acttgtatta taaattgagt tactttgaaat gtcctacgat agagacggag 120
 ttcaaatctc ctcaagtatg gttgaaaaat ggtcttcaat gtaactttaa ataaaaactt 180
 tgtacgtcct cgctaataaa aataatgttt gtttaattac tttatatatg tatttttttaa 240
 tgctatttta tatatgttgt accccaaact tgtctgacca atttaatcag aagaacatgt 300
 agagtgtagg ttgcccggga agatttggat taaagtcttc gtttggttgg gtttggctct 360
 ggtcatgccg gaaaatttat tttccttgta cttcaaatgt tttgcttttt cgatcggaaa 420
 gggaatagga gattaaaggg cctcctttta atatggcaaa cagaattata gcttttagact 480
 gacgctgctg tttagcttca 500

<210> 25

<211> 500

<212> ADN

5 <213> *Medicago truncatula*

<400> 25

ttatggtagt agttttgaaa tgttgggaac ttgtttttca tgttttgta ccatctgttt 60
 taaactatgt actgtctcca tctgacattt taataactcg atcctcgggt tatttttagtt 120
 ttcctattta ttactgcagt acttttgttt caattttgat ttagttgttt ccattatact 180
 tccaattttg gtgttttatt cctttttctt aaaattttga tttatttata cttccgcata 240
 gtgttttttt tacattgcga ttctatttaa attattatgt ttttcattta ggtttacaat 300
 tttggtttag ttgttcccat aatattttca ttgttttagtt gttcgcatag tgttttttac 360
 atttatgttt ttcatttcct aaattaaatt gttaatttga gatgatgctt ttttgtgaac 420
 aatgaaaaca ttcttgatat tttcattggt tcaatgtctt gtataaatat tttcacatgt 480
 tagaattttt atgttggttg 500

<210> 26

<211> 500

<212> ADN

10 <213> *Medicago truncatula*

<400> 26

ES 2 741 223 T3

gagtactctc caacatggac acaccatggg attgtgtaac ataaataatg tgcgtttgt 60
aatgaatgct cgcaactttt ctagctaatt aagctagagt tgaacttgag ctacttttat 120
gtaccctaaa gaggcacaat ctttgctggt gatgtactat gatcatgta taatatgatg 180
aaaatggagt gtgcctcatt ttataatfff tattttcctg agtatatggt tttagggcta 240
aacaccttat aaaaaaaggc cacttagaat atgaaacatg aacttttgta aaaaagtaga 300
gattaaaatt gaaatcaaaa atttttatag gatcaatatt cgaagaattt ttttagaggg 360
atataaatta aatatagttt cggactgacc caaggcacia tccggctccg ctccgggttcg 420
acctgagtc accatgcac tgtcacctta ccattgacac gccctaaaat acattagatc 480
gcagtacaaa ttgagagtta 500

<210> 27
<211> 500
<212> ADN
<213> *Medicago truncatula*

5

<400> 27

caaattgta gtgtttttct gatttagttc agagattgta agtaagatac cccaaaagtt 60
gtattatact atactattat agttagtaaa gcaatgtaat aactgtgcag gatgtcaaaa 120
gaaaagctag aaaaaatgat ttaaggggat atccggatat gagattgagt ccataggagc 180
accacattc atgccacca aatgagtggc ataaatggga cccacataat atattatatt 240
actttatact ttccaattat ttaaaccact caactacatt ttctaaatat ccataccact 300
cctctaaaac tctaaaatgg gtcccactta tcttacaact acaatatact ttaaattata 360
ttttaaatta atatataaaa tgtgtaatga aaatatataa aatgtatcac acaatatact 420
caaatgaat caaatatata tgttaaaaaa attagccggt gcatgagtga aaaaaaaaaa 480
atattaccgt tgcattgagtt 500

<210> 28
<211> 500
<212> ADN
<213> *Medicago truncatula*

10

<400> 28

ES 2 741 223 T3

tgaagaagga taatgattga ttaattgttt aatataaagt tgaggggaatt tttttatatt 60
 ttctataaat tatcaaaata tgttgattgt tgagaataag aattctaggt tcaaaacaga 120
 atcttgaatt gtcaaggagt ctgttaaagtg tgagatttat tattatgttt catttcaaaa 180
 gtattaagtt ttatttgtgt gactatttgg attgtgatta ttgctaaatg tttatacgta 240
 ttaaaatttg catgcttttt gtcccactca aataaaaatt aattagtatt gcttgcttcc 300
 aagttttaga tttactataa tatgtatttt ttttttttag agatacatgt aatatgtata 360
 aatattttgt aacgagcaaa aaaaatacac tctaattatc tcataataga gaaaagacac 420
 tctttatgtg agtgtaaatt cctataaaga aaagagatgt gaaaactacc ctcagtatac 480
 ggataattgc actcacaata 500

<210> 29
 <211> 481
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*
 <400> 29

5

gcagctggaa acttactagt gttaaagttg tatctggctc atttcgagct gggatatatat 60
 atatgtgatt gtggaatttc ttgtggctctg gaagtatttt caacagttgt gatgcagtat 120
 tatggaattt atgacatgcg gtattatgga atttatgaca ttatgtggtg tttgcttcaa 180
 taatatgtat caaaggagtt ttataagact tcatttaaca tttcagatgc ttggatgtgt 240
 tactttatgt ttaccgtgct atgtttttat accagattca agattttaga tgccttaggc 300
 ttggaacaag ttttgattgt ttaacaatta aaaaggtttt atgacctaaa accatggatt 360
 ttcctgattt ccgaaagttt taaaattatt tcaaataaaa tcatggatgt tggtttaagt 420
 ggcgaagtct tctgctcttt cttttcaagt agagtaagat cttggattct agtcaccatg 480
 a 481

<210> 30
 <211> 600
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*
 <400> 30

10

ES 2 741 223 T3

tcattcaatt tgaccctttt gctacattct tgctgtcata gttatttaat ttaatttctt 60
aaggtgcata ttcttttggg gaatttaagc cccccgaaa catggaagga ggttggctgc 120
aaagttcctg aaggataatc gtttttttca ttccctttaa tttttggtat tcattatttc 180
acattttacc taaaacttca gggagtgaga taaagaactc tttctctctg aactgtttat 240
gttgtctact agaaaaaaaa atcctgtaag aggtaaggta ttcttccaaa acaggattct 300
ttttcttata attttacttc attagtttct aagttccttt tcctacattg tataagattc 360
tgtcagtaca tttatggtgc ttatgtagga agtgggactg agtttcttat gaaggaattt 420
atgagttatt gaatatttat tgcaagctat attttagaat acagtatact ttcttcttat 480
gttattattt ttttaagtgt attgtggtgt gttattatta taagctttgt taaactctga 540
tcattttcaa attcaaaaca atgtttagtt caaaggcaaa gctgagttgt gctgattatt 600

<210> 31
<211> 1594
<212> ADN
<213> *Medicago truncatula*

<400> 31

5

ES 2 741 223 T3

actgttaata atttttaaac gtcagcgcac taaaaaacg aaaagacgga cacgtgaaaa 60
 taaaaaacac acactagttt atgacgcaat actattttac ttatgatttg ggtacattag 120
 acaaaaccgt gaaagagatg tatcagctat gaaacctgta tacttcaata cagagacgta 180
 ctcatatcgg atacgtacgc acgaagtatc atattaatta ttttaatttt taataaatat 240
 tttatcggat acttatgtga tactctacat atacacaagg atatttctaa gatactttat 300
 agatacgtat cctagaaaaa catgaagagt aaaaaagtga gacaatgttg taaaaattca 360
 ttataaatgt atatgattca attttagata tgcacagta taattgattc tcgatgaaac 420
 acttaaaatt atatttcttg tggaagaacg tagcgagaga ggtgattcag ttagacaaca 480
 ttaaataaaa ttaatgtaa gttcttttaa tgatgtttct ctcaatatca catcatatga 540
 aatgtaata tgatttataa gaaaattttt aaaaaattta ttttaataat cacatgtact 600
 attttttaa aattgtatct tttataataa tacaataata aagagtaatc agtgtttaatt 660
 tttcttcaa tataagtttt attataaatc attgttaacg taccataagt cattaccgta 720
 tcgtatctta attttttttt aaaaaccgct aattcacgta cccgtattgt attgtacccg 780
 cacctgtatc acaatcgatc ttagttagaa gaattgtctc gaggcggtgc aagacagcat 840
 ataatagacg tggactctct tataccaaac gttgtcgtat cacaaagggt taggtaacaa 900
 gtcacagttt gtccacgtgt cacgttttaa ttggaagagc tgccggtggc gtaatataac 960
 agccaatcga tttttgctat aaaagcaaat caggtaaaact aaacttcttc attcttttct 1020
 tccccatcgc taaaaaccg gttcctttgg aaaagagatt cattcaaacc tagcacccaa 1080

 ttccgtttca aggtataatc tactttctat tcttcgatta ttttattatt attagctact 1140
 atcgtttaat cgatcttttc ttttgatccg tcaaatttaa attcaattag ggttttgttc 1200
 ttttcttca tctgattgaa atccttctga attgaaccgt ttacttgatt ttactgttta 1260
 ttgtatgatt taatcctttg tttttcaaag acagtcttta gattgtgatt aggggttcat 1320
 ataaattttt agatttggat ttttgtattg tatgattcaa aaaatacgtc ctttaattag 1380
 attagtacat ggatattttt taccggattt attgattgtc agggagaatt tgatgagcaa 1440
 gtttttttga tgtctgttgt aaattgaatt gattataatt gctgatctgc tgcttccagt 1500
 tttcataacc catattcttt taaccttgtt gtacacacaa tgaaaaattg gtgattgatt 1560
 catttgtttt tctttgtttt ggattataca ggggt 1594

<210> 32
 <211> 1000
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

5

<400> 32

ES 2 741 223 T3

actgttaata atttttaaac gtcagcgcac taaaaaacg aaaagacgga cacgtgaaaa 60
 taaaaaacac aactagttt atgacgcaat actattttac ttatgatttg ggtacattag 120
 acaaaaccgt gaaagagatg tatcagctat gaaacctgta tacttcaata cagagacgta 180
 ctcatatcgg atacgtacgc acgaagtatc atattaatta ttttaatttt taataaatat 240
 tttatcggat acttatgtga tactctacat atacacaagg atatttctaa gatactttat 300
 agatacgtat cctagaaaaa catgaagagt aaaaaagtga gacaatggtg taaaaattca 360
 ttataaatgt atatgattca attttagata tgcacagta taattgattc tcgatgaaac 420
 acttaaaatt atatttcttg tggagaacg tagcagagaga ggtgattcag ttagacaaca 480
 ttaaataaaa ttaatgttaa gttcttttaa tgatgtttct ctcaatatca catcatatga 540
 aatgtaata tgatttataa gaaaattttt aaaaaattta ttttaataat cacatgtact 600
 attttttaa aattgtatct tttataataa tacaataata aagagtaatc agtgtaatt 660
 tttcttcaa tataagtttt attataaatc attgttaacg tatcataagt cattaccgta 720
 tcgtatctta attttttttt aaaaaccgct aattcacgta cccgtattgt attgtaccgg 780
 cacctgtatc acaatcgatc ttagttagaa gaattgtctc gaggcggtgc aagacagcat 840
 ataatagacg tggactctct tataccaaac gttgtcgtat cacaaaggtg taggtaacaa 900
 gtcacagttt gtccacgtgt cacgttttaa ttggaagagc tgccgttggc gtaatataac 960
 agccaatcga tttttgctat aaaagcaaat caggtaaact 1000

5 <210> 33
 <211> 92
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

<400> 33

aaacttcttc attcttttct tccccatcgc taaaaaacg gttcctttgg aaaagagatt 60
 cattcaaacc tagcacccaa ttccgtttca ag 92

10 <210> 34
 <211> 502
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

<400> 34

ES 2 741 223 T3

gtataatcta ctttctattc ttcgattatt ttattattat tagctactat cgtttaatcg 60
atcttttctt ttgatccgtc aaatttaaatt tcaattaggg ttttgttctt ttctttcatc 120
tgattgaaat ccttctgaat tgaaccgttt acttgatttt actgtttatt gtatgattta 180
atcctttggt tttcaaagac agtctttaga ttgtgattag gggttcatat aaatttttag 240
atttgatttt ttgtattgta tgattcaaaa aatacgtcct ttaattagat tagtacatgg 300
atatttttta cccgatttat tgattgtcag ggagaatttg atgagcaagt ttttttgatg 360
tctgttgtaa attgaattga ttataattgc tgatctgctg cttccagttt tcataacca 420
tattctttta accttgttgt acacacaatg aaaaattggt gattgattca tttgtttttc 480
tttgttttgg attatacagg gt 502

<210> 35

<211> 1141

<212> ADN

<213> *Medicago truncatula*

5

<400> 35

tggattaatt tatttggaact ggtttcgtaa tgagttgtat tcaatcattc tcttctttac 60
aattttgggt gaaagtggtc attgtatttt cttaaataac ttttttgctt atataaaaag 120
agagagaaaa aaagatcgtt tattgtctct actttgatta tagaatagaa gtttaagact 180
taatcaaacy ttataaaata ataaagatag taagtcttgc aaataaaata aaaaatgaga 240
gtgctgataa agccaaaacc ttacacaaat tgagggatta aaaagttact cacgtctatg 300
cataatcata cttacactca atattctcca ccaatgataa aatttgagga gttacttcaa 360
ctttagaaat taattttttt ttttgacaag actttagaaa ttaattatta tatattgagt 420
gtaatatgga ttaatcatat actaattcat tatatgcgtg actagtcaaa caagataaac 480
ctggatggta attgattgta atgcaccacc aacattgaat taaaaattag caagtttttt 540
tttgttggaa aaaattaaca agttaaatac caaaatgtga ttttaattttt ttaatacgca 600

ES 2 741 223 T3

aattttaatg gttaatctgt taggaggaaa aattgtgaat tttttagtgc ataaatcaaa 660
 ccgttgacct ttttattgaa ctogtttagt ctcaactcat atcattggac tctaccttcg 720
 agaatgtacc aaaatgtggt tagttagacc tagcagggcc acataaatga actcgaacat 780
 acttttcttg aaaaattggt cttctcccat ttaaaattgc tcaactccttt gatctatcgg 840
 gagttaactc atactcggca ttattcaacg gtagctaacc cacattgtca ctgtagatt 900
 agttcaatca ttttttaaat cgagtcaacc aatcttaaaa gtctcagcat gagttaacta 960
 ccgctgaaaa atgtcagacc cgagttaact tcatctgaat caagggaatg aacaatttta 1020
 aaagggagaa aagcaatttt cttttcttg aactcattaa ggttccaaat tcttttataa 1080
 aagggccact aactgcttt catatataca ccattcatac atagaaacca atagccaaaa 1140
 a 1141

<210> 36

<211> 1107

<212> ADN

<213> *Medicago truncatula*

5

<400> 36

tggattaatt tatttgact ggtttcgtaa tgagttgtat tcaatcattc tcttctttac 60
 aattttgggt gaaagtggtc attgtatfff cttaaataac ttttttgctt atataaaaag 120
 agagagaaaa aaagatcgtt tattgtctct actttgatta tagaatagaa gtttaagact 180
 taatcaaacg ttataaaata ataaagatag taagtcttgc aaataaaata aaaaatgaga 240
 gtgctgataa agccaaaacc ttacacaaat tgagggatta aaaagttact cacgtctatg 300
 cataatcata cttacactca atattctcca ccaatgataa aatttgagga gttacttcaa 360
 ctttagaaat taatfttttt ttttgacaag actttagaaa ttaattatta tatattgagt 420
 gtaatatgga ttaatcatat actaattcat tatatgcgtg actagtcaaa caagataaac 480
 ctggatggta attgattgta atgcaccacc aacattgaat taaaaattag caagtttttt 540
 tttgttggaa aaaattaaca agttaatac caaaatgtga ttttaattttt ttaatacgc 600
 aattttaatg gttaatctgt taggaggaaa aattgtgaat tttttagtgc ataaatcaaa 660
 ccgttgacct ttttattgaa ctogtttagt ctcaactcat atcattggac tctaccttcg 720
 agaatgtacc aaaatgtggt tagttagacc tagcagggcc acataaatga actcgaacat 780
 acttttcttg aaaaattggt cttctcccat ttaaaattgc tcaactccttt gatctatcgg 840
 gagttaactc atactcggca ttattcaacg gtagctaacc cacattgtca ctgtagatt 900
 agttcaatca ttttttaaat cgagtcaacc aatcttaaaa gtctcagcat gagttaacta 960
 ccgctgaaaa atgtcagacc cgagttaact tcatctgaat caagggaatg aacaatttta 1020

ES 2 741 223 T3

aaagggagaa aagcaatddd cctdddcttg aactcattaa ggttcctaaat tctdddtaaa 1080
 aagggccact acactgcttd catatat 1107
 <210> 37
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*
 5
 <400> 37
 acaccatca tacatagaaa ccaatagcca aaaa 34
 <210> 38
 <211> 298
 <212> ADN
 <213> *Gossypium hirsutum*
 10
 <400> 38
 tgtcgtacag tatttctaca tttgatgtgt gatttgtgaa gaacatcaaa caaacaagc 60
 actggcttta atatgatgat aagtattatg gtaattaatt aattggcaaa aacaacaatg 120
 aagctaaaat tttatttatt gagccttgcg gttactttct tgtgatgatc ttttttattt 180
 tctaattata tatagtttcc ttogctttga aatgctaaag gtttgagaga gttatgttct 240
 ttttctcttc ctcttdcttd ttttaacttta tcaaacaatt tttgaataaa aatgtgag 298
 <210> 39
 <211> 436
 <212> ADN
 <213> *Gossypium barbadense*
 15
 <400> 39
 aacaaaagag tgcctcacat ttgatgcaat agctctgtaa tgtttcattc atttgcttat 60
 ttcggccttg ttttdctcgt attctatggg ctgatgtctc atatgggact ttdctactag 120
 agagcctacg ttactttacc attatattgt attcttdtgag acattattat tatttdttta 180
 ccttdtgagg acactcttdt tttgtatttg aaggaattta ttgtdttatt tgtdttggaat 240
 atgtdttggtt ggatttdttc gattcatata tattatataa aagtaattat gttattaaga 300
 aacgtagtaa gaacttacia atataaggat cgaatcccga acttcatgca aatcaattta 360
 caaccacac aagtdtaaca ttaaattaac gtgattggtt agtaaattca tgtdtdctctg 420
 ttdaatttdgt tgaatt 436
 20
 <210> 40
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> *Gossypium barbadense*
 <400> 40

ES 2 741 223 T3

tgatcacctg tcgtacagta tttctacatt tgatgtgtga tttgtgaaga acatcaaaca 60
 aaacaagcac tggctttaat atgatgataa gtattatggt aattaattaa ttggcaaaaa 120
 caacaatgaa gctaaaatth tatttattga gccttgccgt taatttcttg tgatgatctt 180
 tttttttatt ttctaattat atatagtttc ctttgctttg aaatgctaaa ggtttgagag 240
 agttatgctc tttttttctt cctctttctt ttttaacttt atcatacaaa ttttgaataa 300
 aaatgtgagt acatt 315

<210> 41

<211> 315

<212> ADN

5 <213> *Gossypium barbadense*

<400> 41

accatatgac actggtgcat gtgccatcat catgcagtaa tttcatggta tatcttaatt 60
 atatggttaa taaaaaaaaag atggtgagtg aataatgtgc gtgcattcct ccatgcacca 120
 atggtgaatc tctttgcata catagagatt ctgaatgatt atagtttatg ttgtagtgaa 180
 attaattttg aatgttgttt ttaaatttta atgtcacttg gcttgattta tgttttaacg 240
 aagcttatgt tatgtattht actttaatga tattgcatgt attgttaatt taacattgct 300
 tgatcagtat actct 315

<210> 42

<211> 712

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(712)

15 <223> Grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción quiméricos o EXP.

<400> 42

ES 2 741 223 T3

ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
 cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg 120
 ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 180
 agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240
 aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat tgagactttt caacaaaggg taatatccgg 300
 aaacctctc ggattccatt gccagctat ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa 360
 ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc 420
 ctctgccgac agtgggtccca aagatggacc cccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga 480
 agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt gatatctcca ctgacgtaag 540
 ggatgacgca caatcccact atccttcgca agacccttcc tctatataag gaagttcatt 600
 tcatttggag aggacactct agacagaaaa atttgctaca ttgtttcaca aacttcaaat 660
 attattcatt tatttgtcag ctttcaaact ctttgtttct tgtttgttga tt 712

<210> 43
 <211> 613
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(613)
 <223> Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor potenciado.

10

<400> 43
 ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
 cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg 120
 ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 180
 agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240
 aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat tgagactttt caacaaaggg taatatccgg 300
 aaacctctc ggattccatt gccagctat ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa 360
 ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc 420
 ctctgccgac agtgggtccca aagatggacc cccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga 480
 agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt gatatctcca ctgacgtaag 540
 ggatgacgca caatcccact atccttcgca agacccttcc tctatataag gaagttcatt 600
 tcatttggag agg 613

<210> 44
 <211> 2001
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

ES 2 741 223 T3

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2001)

<223> Secuencia codificante de GUS de *E. coli* nativo con intrón procesable.

5

<400> 44

```
atggtccgtc ctgtagaac cccaaccggt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttacia 120
gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt tttaacgata agttcgccga tgcagatatt 180
cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240
```

ES 2 741 223 T3

ggccagcgta tcgtgctgcg tttcogatgog gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300
 aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccg 360
 tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtaag tttctgcttc tacctttgat atatatataa 420
 taattatcat taattagtag taatataata tttcaaata ttttttcaaa ataaaagaat 480
 gtagtatata gcaattgctt ttctgtagtt tataagtgtg tatattttaa tttataactt 540
 ttctaataata tgacccaaat ttgttgatgt gcaggtatca ccgtttgtgt gaacaacgaa 600
 ctgaactggc agactatccc gccgggaatg gtgattaccg acgaaaacgg caagaaaaag 660
 cagtcttact tccatgattt ctttaactat gccggaatcc atcgcagcgt aatgctctac 720
 accacgccga acacctgggt ggacgatata accgtgggga cgcattgtgc gcaagactgt 780
 aaccacgctg ctgttgactg gcaggtgggt gccaatgggt atgtcagcgt tgaactgctg 840
 gatgcggatc aacaggtggg tgcaactgga caaggcacta gcgggacttt gcaagtgggt 900
 aatccgcacc tctggcaacc ggggtgaagg ttatctctatg aactgtgctg cacagccaaa 960
 agccagacag agtgtgatat ctaccgcctt cgcgtcggca tccggtcagt ggtagtgaag 1020
 ggccaacagt tcttgattaa ccacaaaacc ttctacttta ctggcttttg tcgtcatgaa 1080
 gatgcggact tgctgggcaa aggatcogat aacgtgctga tgggtgcacga ccacgcatta 1140
 atggactgga ttggggccaa ctctaccgt acctcgcatt acccttacgc tgaagagatg 1200
 ctgcactggg cagatgaaca tggcatcgtg gtgattgatg aaactgctgc tgtcggcttt 1260
 aacctctctt taggcattgg tttcgaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcgaa 1320
 gaggcagtca acggggaaac tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg 1380
 cgtgacaaaa accaccaag cgtggatgat tggagtattg ccaacgaacc ggatacccg 1440
 ccgcaagggt cacgggaata tttcgcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgcaccg 1500
 acgcgtccga tcacctgctt caatgtaatg ttctgcgacg ctacaccga taccatcagc 1560
 gatctctttg atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgt 1620
 ttggaaacgg cagagaagggt actggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat 1680
 cagccgatta tcatcaccga atacggcgtg gatacgtag cgggctgca ctcaatgtac 1740
 accgacatgt ggagtgaaga gtatcagtggt gcatggctgg atatgtatca ccgcgtcttt 1800
 gatcgcgtca gcgccgtcgt cgggtgaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg 1860
 caaggcatat tgcgcgttgg cggtaacaag aaaggatct tcaactcgcga ccgcaaaccg 1920
 aagtcggcgg cttttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaaccg 1980
 cagcagggag gcaacaatg a 2001

<210> 45
 <211> 1653

ES 2 741 223 T3

<212> ADN

<213> *Photinus pyralis*

<400> 45

```

atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggg ccggcgccat tctatcctct agaggatgga 60
accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tggacaatt 120
gcttttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaatactt cgaaatgtcc 180
gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgta 240
tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtggttg gcgcggttatt tatcggagtt 300
gcagttgccc ccgcgaacga cttttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgaacatt 360
tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaacgtgcaa 420
aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaacgga ttaccagggga 480
tttcagtcga tgtacacggt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatacgat 540
tttgtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcctctgga 600
tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt cagattctcg 660
catgccagag atcctatfff tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat ttttaagtgt 720
gttccattcc atcacggttt tggaatgfff actacactcg gatatttgat atgtggattt 780
cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtfff tacgatccct tcaggattac 840
aaaattcaaa gtgcggttgc agtaccaacc ctatfffcat tcttcgcaa aagcactctg 900
attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctggggggcg acctctttcg 960
aaagaagtcg ggggaagcgg tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatacg acaaggatat 1020
gggctcactg agactacatc agctattctg attacaccg agggggatga taaaccgggc 1080
gcggtcggta aagttgttcc atfffftgaa gcgaaggttg tggatctgga taccgggaaa 1140
acgctgggcg ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatgtccggt 1200
tatgtaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct 1260
ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg cttgaagtct 1320
ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attgttacia 1380
caccccaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggatgaactt 1440
cccgccgccc ttgttgtfff ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500
tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtg gtttgtggac 1560
gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aatcagaga gatcctcata 1620
aaggccaaga agggcggaat gtccaaattg taa 1653

```

ES 2 741 223 T3

<211> 936
 <212> ADN
 <213> *Renilla reniformis*

<400> 46

	atggccttcca aggtgtacga ccccgagcaa cgcaaacgca tgatcactgg gcctcagtgg	60
	tgggctcgct gcaagcaaat gaacgtgctg gactccttca tcaactacta tgattccgag	120
	aagcacgccg agaacgccgt gatttttctg catggtaacg ctgcctccag ctacctgtgg	180
	aggcacgtcg tgcctcacat cgagcccgtg gctagatgca tcatccctga tctgatcgga	240
	atgggtaagt ccggcaagag cgggaatggc tcatatcgcc tcctggatca ctacaagtac	300
	ctcaccgctt ggttcgagct gctgaacctt ccaaagaaaa tcatctttgt gggccacgac	360
	tggggggctt gtctggcctt tcaactactcc tacgagcacc aagacaagat caaggccatc	420
	gtccatgctg agagtgtcgt ggacgtgatc gagtcctggg acgagtggcc tgacatcgag	480
	gaggatatcg ccctgatcaa gagcgaagag ggcgagaaaa tggtgcttga gaataacttc	540
	ttcgtcgaga ccatgctccc aagcaagatc atgcggaaac tggagcctga ggagtctgct	600
	gcctacctgg agccattcaa ggagaagggc gaggttagac ggctaccct ctctggcct	660
	cgcgagatcc ctctcgtaa gggaggcaag cccgacgtcg tccagattgt ccgcaactac	720
	aacgcctacc ttcggggccag cgacgatctg cctaagatgt tcatcgagtc cgaccctggg	780
	ttcttttcca acgctattgt cgagggagct aagaagttcc ctaacaccga gttcgtgaag	840
	gtgaagggcc tccacttcag ccaggaggac gctccagatg aaatgggtaa gtacatcaag	900
5	agcttcgtgg agcgcgtgct gaagaacgag cagtaa	936

<210> 47
 <211> 1446
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1446)
 <223> Grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción quiméricos o EXP.
 <400> 47

ES 2 741 223 T3

```

ggtccgattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60
ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aaggtaggctc ctacaaatgc 120
catcattgcg ataaaggaaa ggccatcggt gaagatgcct ctgccgacag tggccccaaa 180
gatggacccc caccacgag gagcatcggt gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca 240
aagcaagtgg attgatgtga tggtaggatt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga 300

aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag 360
gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420
tctgccgaca gtgggtccca agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480
gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg 540
gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttctt ctatataagg aagttcattt 600
catttgagga ggacacgctg acaagctgac tctagcagat ctaccgtctt cggtagcgcg 660
tcactccgcc ctctgccttt gttactgcca cgtttctctg aatgctctct tgtgtggtga 720
ttgctgagag tggtttagct ggatctagaa ttacactctg aaatcgtggt ctgcctgtgc 780
tgattacttg ccgtcctttg tagcagcaaa atatagggac atggtagtac gaaacgaaga 840
tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taatttggtg cttagcggta tttatttaag 900
cacatggtgg tgttataggg cacttgatt cagaagtttg ctgttaattt aggcacaggc 960
ttcactactac atgggtcaat agtataggga ttcatattat aggcgatact ataataattt 1020
gttctgtctgc agagcttatt atttgccaaa attagatatt cctattctgt ttttgtttgt 1080
gtgctgttaa attgttaacg cctgaaggaa taaatataaa tgacgaaatt ttgatgttta 1140
tctctgctcc tttattgtga ccataagtca agatcagatg cacttgtttt aatatattgtt 1200
gtctgaagaa ataagtactg acagtatttt gatgcattga tctgcttgtt tgttgaaca 1260
aaatttaaaa ataaagagtt tcctttttgt tgctctcctt acctcctgat ggtatctagt 1320
atctaccaac tgacactata ttgcttctct ttacatacgt atcttgctcg atgccttctc 1380
cctagtgttg accagtgtta ctcacatagt ctttgctcat ttcattgtaa tgcagatacc 1440

aagcgg 1446

```

<210> 48

<211> 675

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(675)

<223> Grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción quiméricos o EXP.

10 <400> 48

ES 2 741 223 T3

ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
 cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaagggtggct cctacaaatg 120
 ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 180
 agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240
 aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg 300

 gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 360
 aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420
 cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccaccacac gaggagcatc gtggaaaaag 480
 aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540
 gggatgacgc acaatcccac tctccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat 600
 ttcatttga gaggaacat cttccacaca ctcaagccac actattggag aacacacagg 660
 gacaacacac cataa 675

<210> 49

<211> 253

<212> ADN

5 <213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 49

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

<210> 50

<211> 841

<212> ADN

10 <213> *Glycine max*

<400> 50

ES 2 741 223 T3

ggcaaaaaca ttttaatacgt attattttaag aaaaaaatat gtaataatat atttatattt 60
 taatatctat tcttatgtat tttttaaaaa tctattatat attgatcaac taaaatattt 120
 ttatatctac acttattttg cattttttatc aatttttcttg cgttttttgg catatttaat 180
 aatgactatt ctttaataat caatcattat tcttaccatgg tacatattgt tgggaaccata 240
 tgaagtgtcc attgcatttg actatgtgga tagtgttttg atccaggcct ccatttgccg 300
 cttattaatt aatttggtaa cagtccgtac taatcagtta cttatccttc ctccatcata 360
 attaatcttg gtagtctcga atgccacaac actgactagt ctcttggatc ataagaaaaa 420
 gccaaaggaac aaaagaagac aaaacacaat gagagtatcc tttgcatagc aatgtctaag 480
 ttcataaaat tcaaacaaaa acgcaatcac acacagtga catcacttat ccactagctg 540
 atcaggatcg ccgctcaag aaaaaaaaaac tggaccccaa aagccatgca caacaacacg 600
 tactcacaaa ggtgtcaatc gagcagccca aacattcac caactcaacc catcatgagc 660
 ccacacattt gttgtttcta acccaacctc aaactcgtat tctcttccgc cacctcattt 720
 ttgtttattt caacacccgt caaactgcat gccaccccggt ggccaaatgt ccatgcatgt 780
 taacaagacc tatgactata aatatctgca atctcggccc aggttttcat catcaagaac 840
 c 841

<210> 51
 <211> 422
 <212> ADN
 <213> Virus del mosaico de la dalia

5

<400> 51

atcaacggag aaacaaagat aaaaatcaat tactcacatg aaagagtatt gatcacgagt 60
 cactatggag cgacaatctc cagacaggat gtcagcatct tatcttcctt tgaagaaagc 120
 atcatcaata acgatgtaat ggtggggaca tccactaagt tattgctctg caaacagctc 180
 aaaaagctac tggccgacaa tcataattgc tcggcatgtg caggtggggc ctccactagc 240
 aataatacaa gctttacagc ttgcagtgac tcatcctcca ataatggaga aaaagacgtc 300
 agcagtgacg aacaagggtc gaaagacttg cctatataag ggcattctcc cctcagttga 360
 agatcatcga aagttggagc aataaactct ctcttcaaca aatctatctt ttatctttta 420
 tc 422

<210> 52
 <211> 595
 <212> ADN
 <213> Cepa del virus de la estría del plátano Acuminata Vietnam

10

<400> 52

ES 2 741 223 T3

agacatcctg gaccaatatg ctgaagatta tgctacctac accaggatag gacttgaagc 60
 acttaacctt gaagattggt tcgaagaacc agaaccgat ccacctaacc ctgtggaccg 120
 ccagaggata gaggacatcc tggacctact gaacgtcagc aatgacgact gaaagattcc 180
 caggacaccg gcggaagtgg tggaccctagt ctaggtgoga tgcttagtcg cgcacgatga 240
 ctatgtcggg aggcattctt gctttcggca aacttttagta atactttaag gaaagtattg 300
 tacaagttag gtgcagagac aataatgcac ccagcttttag ctttgtttat ggaattattg 360
 tgtcggttgc attattggat gcctgcgtgc accctaagca atccccggcc ctcttctcta 420
 taagaggagc ccttgcaatc agttgcaagc attcaagttt cccactgcaa gcttacttct 480
 gagtttgagt tcaagttcaa taaaattcaa gctttcctct tacattctgt tcttgaaagg 540
 ttcgatctaa tcgagcgagt agagaacaag atcttttggg atttccgccc ttcca 595

<210> 53
 <211> 382
 <212> ADN
 <213> Virus del anillo grabado del clavel

5

<400> 53

atcctcaact tccaatcaga agttagcagc tgcaagcttt taggattcca tagtgataag 60
 atatgttctt atctaaacaa aaaagcaagc gtcggcaaac catacagctg tccacaaaaa 120
 ggaaaggctg taataacaag cggaccacgc ttctcagtgg aagatacttt atcagacact 180
 gaataatgga tggaccctac cacgattaaa gaggagcgtc tgtctaaagt aaagtagatg 240
 cgtctttaat aattcatcta ctttagacgt catgcatgac gtttaacatg cattgtatcc 300
 agatcctccc tggctatata aaggagatta aatttcattg ttaaggcatc gaaaaaaaaa 360
 tttcaagtct atctctcaag aa 382

<210> 54
 <211> 1235
 <212> ADN
 <213> *Cucumis melo*

10

<400> 54

ES 2 741 223 T3

```

aaattttaat aattaaaatg aacaatTTTT caagagtaat agagtttgag agatgtcaga 60
gaagtttgag gaagaagata acaagtggga gaagagaata agtttgttgt gtgaaagaga 120
aggggaaatt tcattcaagg gtatattgaa ctttttactc aaattttgta agtctatTTT 180
ttccgatcaa tcctaaaatc acacacaccc ttaaaaaatg gattatattt ggcaatTTTc 240
catgataaac tcattTTTta tttagagtta ttttttcaac gagatattaa cagtttttagt 300
tcatatacta attgtaagaa tagtttcttt taagttgaat agaatttttg aaactTTTta 360
tagttcaaaa ggtatTTTtg aaacaaaata agaatgTTTT tgaactTTTT ataaaaagaa 420
ttgagatTTTt tttgaaatTTt ttgataaaga gaaaagaaaa gaagaaagaa aaaagaaaaa 480
caagtttgta gaactccgtg ggaaaatcgt cgagggccct gtgaaggaat tttgaaatta 540
taatgaggggt atTTTcgtca acaaggggaat ttagacatcg tatataagca tcctcaaacc 600
ctataattaa gcccttcaat ccaattgcc a ttctccatct ctccgcca gggtttaaga 660
gcagcttctc tcctcaggtt ggggtttccc cctatcttct tcattcttcc tcttctcgat 720
ttctttcttc tatttgctcg atagtctctt atttcttgag cttttgctgt ttttctcctg 780
tacatcctaa catgaattat aacttggttt tgatTTTgtc ttttacttct gtattaaaca 840
actTTTctta ccctTTTatt ctctcttct tcttcgtgtc cctgcccttt tgTTTTatg 900
ctaattttat gtttctgTTt atcaatctat cgagggcgtga cctgtcgttc ttccaatagc 960
gtagatctgc acttaatcta ttctagctga ttggattggt cgTTTTcgt tttTTaatt 1020
tattttctct gttctagTtc cgataaattt ttttatatat aattaacaag ttctccagcc 1080
aaaagggtta atattgcgtt ggatattTTa atTTTtacgt tatttagatg tgtgaatcta 1140
ataaaattag ggttattcat aaatttcagt aatgatattt tggttatctg ttcttgctgt 1200
tcctgTTTcg cagttctTTt acctaattatt caagc 1235

```

<210> 55

<211> 1865

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1865)

<223> Grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción quiméricos o EXP.

10 <400> 55

ES 2 741 223 T3

aattctcagt ccaaagcctc aacaagggtca gggtacagag tctccaaacc attagccaaa 60
agctacagga gatcaatgaa gaatcttcaa tcaaagtaaa ctactgttcc agcacatgca 120
tcatggtcag taagtttcag aaaaagacat ccaccgaaga cttaaagtta gtgggcatct 180
ttgaaagtaa tcttgtcaac atcgagcagc tggcttgtgg ggaccagaca aaaaaggaat 240
ggcgcagaat tgtagggcgc acctaccaa agcatctttg cctttattgc aaagataaag 300
cagattcctc tagtacaagt ggggaacaaa ataacgtgga aaagagctgt cctgacagcc 360
cactcactaa tgcgtatgac gaacgcagtg acgaccacaa aagaattagc ttgagctcag 420
gatttagcag cattccagat tgggttcaat caacaaggta cgagccatat cactttattc 480
aaattggtat cgccaaaacc aagaaggaac tcccatcctc aaaggtttgt aaggaagaat 540
tctcagtcca aagcctcaac aaggtcaggg tacagagtct ccaaaccatt agccaaaagc 600
tacaggagat caatgaagaa tcttcaatca aagtaaacta ctgttccagc acatgcatca 660
tggtcagtaa gtttcagaaa aagacatcca ccgaagactt aaagttagtg ggcatctttg 720
aaagtaatct tgtcaacatc gagcagctgg cttgtgggga ccagacaaaa aaggaatggt 780
gcagaattgt tagggcacc taccaaaaagc atctttgcct ttattgcaaa gataaagcag 840
attcctctag tacaagtggg gaacaaaata acgtggaaaa gagctgtcct gacagcccac 900
tcactaatgc gtatgacgaa cgcagtgacg accacaaaag aattccctct atataagaag 960
gcattcattc ccatttgaag gatcatcaga tacaaccatc ttccacacac tcaagccaca 1020
ctattggaga acacacaggg acaacacacc ataacggacc gaccgtcttc ggtacgcgct 1080
cactccgccc tctgcctttg ttactgccac gtttctctga atgctctctt gtgtggtgat 1140
tgctgagagt ggtttagctg gatctagaat tacactctga aatcgtgttc tgcctgtgct 1200
gattacttgc cgtcctttgt agcagcaaaa tatagggaca tggtagtacg aaacgaagat 1260
agaacctaca cagcaatacg agaaatgtgt aatttgggtgc ttagcgggat ttatttaagc 1320

ES 2 741 223 T3

acatgttggt gttatagggc acttggattc agaagtttgc tgttaattta ggcacaggct 1380
 tcatactaca tgggtcaata gtatagggat tcatattata ggcgatacta taataatttg 1440
 ttcgtctgca gagcttatta tttgccaaaa ttagatattc ctattctggt tttgtttgtg 1500
 tgctgttaaa ttgttaacgc ctgaaggaat aatataaat gacgaaattt tgatgtttat 1560
 ctctgctcct ttattgtgac cataagtcaa gatcagatgc acttgtttta aatattgttg 1620
 tctgaagaaa taagtactga cagtattttg atgcattgat ctgcttggtt gttgtaacaa 1680
 aatttaaaaa taaagagttt cctttttgtt gctctcctta cctcctgatg gtatctagta 1740
 tctaccaact gacactatat tgottctott tacatacgtta tcttgctcga tgccttctcc 1800
 ctagtgttga ccagtgttac tcacatagtc tttgctcatt tcattgtaat gcagatacca 1860
 agcgg 1865

<210> 56
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

5

<400> 56

attaatcgat cctccgatcc ctttaattacc ataccattac accatgcatc aatatccata 60
 tatatataaa ccctttcgca cgtacttata ctatgttttg tcatacatat atatgtgtcg 120
 aacgatcgat ctatcactga tatgatatga ttgatccatc agcctgatct ctgtatcttg 180
 ttatttgtat accgtcaaat aaaagtttct tccacttggt ttaataatta gctactctca 240
 tctcatgaac cctatatata actagtttaa tttgctgtca attgaacatg atgatcgatg 300

<210> 57
 <211> 892
 <212> ADN
 <213> *Nicotiana tabacum*

10

<400> 57

gttagctatg ttttttttcc ctttaaatatt ttaatgtatt tcttgtaata tttgtttgtg 60
 tattgaagat tgaatcttga tgattgattg ttggtctgac tacagctggg ttttgtgtta 120
 tgtaactatt tttaactatt ttggatagag gtctgtttga tgtgatgttc ttgattataa 180
 aataccatc ctactttgtt atctcatatc tggttggaac atgagcaatt tcatttctcc 240
 tagttcttga attaaaaacc tgaaagtatt gtgcaaaaag atgctaggaa tgagactatc 300
 attgttttga tgcaatatgt tcttttaagt aataggtgtt ttgtaagaag tctacgcagt 360
 tctggatgta ttttactact cgggaaaact ggatagttgg atacttatta tgtataggaa 420
 gtaaagtgtg ggattataat gcctttctct gccatctgct ctttgtatth tgtgtaaagc 480

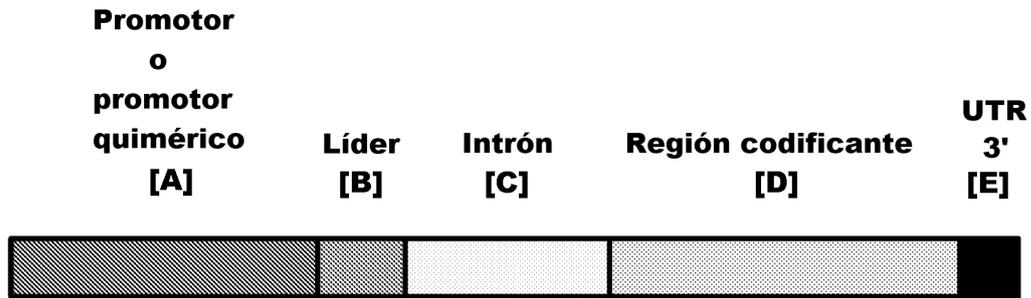
ES 2 741 223 T3

ttggcatgcc tctcgtcaga tagccatcgc taccgtacat tcttttaaga atgaagcact 540
tagacacttg ctcgtttctg cctttgtcac attgaccag catcatataa tctgaaagat 600
tggttagcag ttggctgcta ttttaacttgt atgttaaac aattgatttt catgtgtatc 660
tcctcctttt gtgctttgtg cttcttcata aaagaaagaa aacatacatt cggttgtgct 720
ctcctccttt ttcaatgga gagaggaaga acagataatt ttattgctgc tntaggtatt 780
tgacatctgt gatattttca tagtaagggt ttgttttttc ctttttattt agttcaagat 840
tgttcatga atttcataa gcgtaatacc atagttcttt tatttgctac ag 892

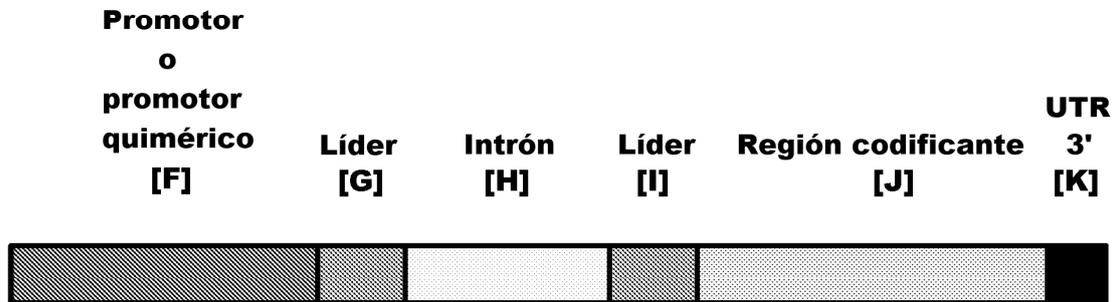
REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada entre el grupo que consiste en:
- 5 a) una secuencia de ADN con al menos el 85 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 22;
- b) una secuencia de ADN que comprende la SEQ ID NO: 22 y
- c) un fragmento de la SEQ ID NO: 22, en la que el fragmento tiene actividad reguladora de genes;
- en la que dicha secuencia de ADN está unida operativamente a una molécula de ADN transcribible heteróloga.
2. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de ADN tiene al menos el 90 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 22.
3. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de ADN tiene al menos el 95 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 22.
4. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que la molécula de polinucleótido transcribible heteróloga comprende un gen de interés agronómico.
- 15 5. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 4, en la que el gen de interés agronómico confiere tolerancia a herbicidas en las plantas.
6. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 4, en la que el gen de interés agronómico confiere resistencia a plagas en las plantas.
7. Una célula vegetal transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada entre el grupo que consiste en:
- 20 a) una secuencia de ADN con al menos el 85 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 22;
- b) una secuencia de ADN que comprende la SEQ ID NO: 22 y
- c) un fragmento de la SEQ ID NO: 22, en la que el fragmento tiene actividad reguladora de genes;
- 25 en la que dicha secuencia de ADN está unida operativamente a una molécula de ADN transcribible heteróloga.
8. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 7, en la que dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal de monocotiledónea.
9. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 7, en la que dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal de dicotiledónea.
- 30 10. Una planta transgénica, o parte de la misma, que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada entre el grupo que consiste en:
- a) una secuencia de ADN con al menos el 85 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 22;
- b) una secuencia de ADN que comprende la SEQ ID NO: 22 y
- 35 c) un fragmento de la SEQ ID NO: 22, en la que el fragmento tiene actividad reguladora de genes;
- en la que dicha secuencia de ADN está unida operativamente a una molécula de ADN transcribible heteróloga.
11. Una planta de progenie de la planta transgénica de la reivindicación 10, o una parte de la misma, en la que la planta de progenie o parte de la misma comprende dicha molécula de ADN recombinante.
12. Una semilla transgénica de la planta transgénica de la reivindicación 10 en la que la semilla transgénica comprende la molécula de ADN recombinante.
- 40 13. Un procedimiento de producción de una planta transgénica que comprende:
- a) transformar una célula vegetal con la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 para producir una célula vegetal transformada; y
- b) regenerar una planta transgénica a partir de la célula vegetal transformada.

Configuración de casete de transgén 1



Configuración de casete de transgén 2



Configuración de casete de transgén 3

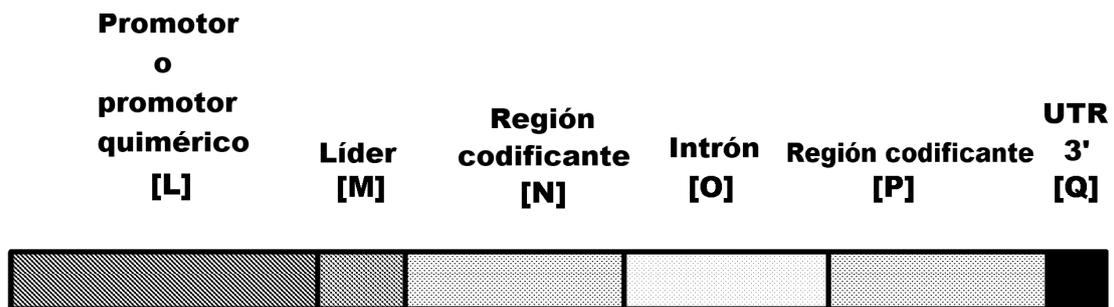


FIG. 1