

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 917**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2013 PCT/US2013/036011**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13158442**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2013 E 13777634 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2838996**

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

30 Prioridad:

**20.04.2012 US 201261635945 P**  
**14.03.2013 US 201313830403**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.02.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**AHRENS, JEFFREY;**  
**CHERIAN, SHOBA;**  
**LOIDA, PAUL, J.;**  
**LUTFIYYA, LINDA, L.;**  
**WU, WEI y**  
**XIE, JIALI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 743 917 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 en plantas y usos de los mismos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de la biología molecular vegetal y la modificación genética en plantas. Más específicamente, la presente invención se refiere a moléculas de ADN útiles para la modulación de la expresión genética en plantas.

**Antecedentes de la invención**

10 Los elementos reguladores son elementos genéticos que regulan la actividad genética modulando la transcripción de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que se une operativamente. Dichos elementos incluyen promotores, líderes, intrones, y regiones 3' no traducidas y son útiles en el campo de la biología molecular vegetal y modificación genética en plantas.

15 Los cultivos transgénicos que expresan transgenes que transmiten una ventaja a una planta durante la germinación en condiciones de estrés por frío y humedad necesitan elementos reguladores que poseen los patrones de expresión en tejidos que son los más beneficiosos para la expresión de dichos transgenes. Dichos elementos reguladores se deberían expresar suficientemente en las semillas en desarrollo para hacer posible el almacenamiento de productos transgénicos que puedan actuar rápidamente cuando la semilla germina en condiciones de frío y/o humedad, así como proporcionar la expresión durante los primeros estadios de germinación y el establecimiento de la plántula. En consecuencia, la presente invención proporciona moléculas de ADN que comprenden elementos reguladores que presenten niveles más altos de expresión en la semilla en desarrollo y germinación y se pueden utilizar para dirigir la expresión de transgenes que proporcionan un beneficio en condiciones de germinación en frío y/o humedad. Los promotores del maíz preferidos para el embrión se desvelan en el documento WO 2005/113771.

**Sumario de la invención**

25 La presente invención proporciona moléculas de ADN que comprenden elementos reguladores genéticos para su uso en plantas. La presente invención también proporciona células vegetales, plantas, partes de plantas y semillas transgénicas que comprenden los elementos reguladores. Las secuencias se proporcionan unidas operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir. La molécula de polinucleótido que se puede transcribir es heteróloga con respecto a la secuencia reguladora que se proporciona en el presente documento. Una secuencia de un elemento regulador comprendido en las moléculas de ADN de la invención está por lo tanto unida operativamente a una molécula de polinucleótido heteróloga que se puede transcribir. La presente invención también proporciona casetes transgénicos que comprenden la molécula de ADN de la invención que comprende los elementos reguladores unidos operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir.

30 En un aspecto, la invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN seleccionada de entre el grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos aproximadamente un 95 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6, u 8, en las que la secuencia tiene una actividad promotora; (b) una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6 u 8; y (c) un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6 u 8, en las que el fragmento tenga una actividad promotora; en el que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula de polinucleótido heteróloga que se puede transcribir. En una realización, el fragmento comprende la SEQ ID NO: 2. En una realización, la molécula heteróloga que se puede transcribir comprende un gen de interés agronómico. En otras realizaciones, el gen de interés agronómico transmite una tolerancia a los herbicidas o resistencia a las plagas en las plantas.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona una planta transgénica que comprende una molécula de ADN heteróloga que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos aproximadamente un 95 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6 u 8; (b) una secuencia que comprenda cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6 u 8; y (c) un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6 u 8, en las que el fragmento tenga una actividad promotora; en el que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula de polinucleótido heteróloga que se puede transcribir. En realizaciones, la célula vegetal transgénica puede ser una célula vegetal de monocotiledónea o una célula vegetal de dicotiledónea.

45 En otras realizaciones, la invención proporciona una planta transgénica o parte de la misma, que comprende una molécula de ADN seleccionada de entre el grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos aproximadamente un 95 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6 u 8; (b) una secuencia que comprenda cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6 u 8; y (c) un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6 u 8, en las que el fragmento tenga una actividad promotora; en el que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula de polinucleótido heteróloga que se puede transcribir. En otra realización, la invención proporciona una progenie de plantas de dicha planta transgénica, en la que la progenie de plantas o parte de la misma comprende la molécula de ADN que se ha descrito anteriormente. En otra realización más, la invención proporciona una semilla transgénica, en la que la semilla comprende la molécula de ADN que se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto, la invención proporciona un casete transgénico que comprende una molécula de ADN seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 6 y 8, en el que la molécula de ADN está unida operativamente a una secuencia codificante heteróloga que está unida operativamente a una 3' UTR seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 11, 12, y 13. En una realización, el casete transgénico comprende la molécula de ADN presentada como la SEQ ID NO: 1, en la que el grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión está unido operativamente a una secuencia codificante heteróloga que está unida operativamente a la 3' UTR presentada como SEQ ID NO: 10. En otra realización más, el casete transgénico comprende la molécula de ADN presentada como SEQ ID NO: 6, en el que el grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión está unido operativamente a una secuencia codificante heteróloga que está unida operativamente a una 3' UTR seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11 y 12. En otra realización más, el casete transgénico comprende la molécula de ADN presentada como la SEQ ID NO: 8, en el que el grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión está unido operativamente a una secuencia codificante heteróloga que está unida operativamente a una 3' UTR seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12 y 13.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de expresión de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que comprende la obtención de una planta transgénica que comprende una secuencia de ADN seleccionada de entre el grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos aproximadamente un 95 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6 u 8; (b) una secuencia que comprenda cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6 u 8; y (c) un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6 u 8, en las que el fragmento tiene una actividad promotora; en el que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula de polinucleótido heteróloga que se puede transcribir, y el cultivo de la planta, en la que se expresa el polinucleótido que se puede transcribir.

### **Breve descripción de las figuras**

**La FIG. 1** - muestra la expresión de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en tejidos embrionarios y el endospermo de maíz transgénico transmitida por diferentes configuraciones del casete transgénico. Cada configuración de casete transgénico está comprendido por la secuencia de nucleótidos codificante de GUS unida operativamente a los grupos de elementos transcripcionales reguladores de la expresión EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1 (SEQ ID NO: 6) y EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1 (SEQ ID NO: 8) y las 3' UTR T-Os.CLUS33428\_1-1:1:1 (SEQ ID NO: 11), T-Os.Mth-1:1:1 (SEQ ID NO: 12), y T-Os.Ara5-1:1:1 (SEQ ID NO: 13), como se muestra en la Tabla 3 del Ejemplo 3.

**La FIG. 2** - muestra la expresión de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en tejidos seleccionados de maíz transgénico transmitida por diferentes configuraciones del casete transgénico. Cada configuración de casete transgénico está comprendido por la secuencia de nucleótidos codificante de GUS unida operativamente a los grupos de elementos transcripcionales reguladores de la expresión EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1 (SEQ ID NO: 6) y EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1 (SEQ ID NO: 8) y las 3' UTR T-Os.CLUS33428\_1-1:1:1 (SEQ ID NO: 11), T-Os.Mth-1:1:1 (SEQ ID NO: 12), y T-Os.Ara5-1:1:1 (SEQ ID NO: 13), como se muestra en la Tabla 3 del Ejemplo 3.

### **Breve descripción de las Secuencias**

**SEQ ID NO: 1** - secuencia de un grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión o EXP, EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1, comprendido por el promotor, P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO: 2), que está unida operativamente en 5' al líder, L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO: 4), que está unido operativamente al intrón, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 5).

**SEQ ID NO: 2** - secuencia del promotor, P-Zm.Nac-1:1:2.

**SEQ ID NO: 3** - secuencia comprendida por el promotor, P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO: 2), que está unida operativamente en 5' al líder, L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO: 4).

**SEQ ID NO: 4** - secuencia del líder, L-Zm.Nac-1:1:1.

**SEQ ID NO: 5** - secuencia del intrón, I-Zm.DnaK-1:1:1.

**SEQ ID NO: 6** - secuencia de un grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión o EXP, EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1, que está comprendido por el promotor, P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO: 2), que está unida operativamente en 5' al líder, L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO: 4), que está unido operativamente al intrón, I-Os.FBA-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 7).

**SEQ ID NO: 7** - secuencia del intrón, I-Os.FBA-1-1:1:1.

**SEQ ID NO: 8** - secuencia de un grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión o EXP, EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1, que está comprendido por el promotor, P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO: 2), que está unida operativamente en 5' al líder, L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO: 4), que está unido operativamente al intrón, I-Os.Cab-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 9).

**SEQ ID NO: 9** - secuencia del intrón, I-Os.Cab-1-1:1:1.

**SEQ ID NO: 10** - secuencia de la 3' UTR, T-AGRtu.nos-1:1:13.

**SEQ ID NO: 11** - secuencia de la 3' UTR, T-Os.CLUS33428\_1-1:1:1.

**SEQ ID NO: 12** - secuencia de la 3' UTR, T-Os.Mth-1:1:1.

**SEQ ID NO: 13** - secuencia de la 3' UTR, T-Os.Ara5-1:1:1.

**SEQ ID NO: 14** - secuencia codificante del marcador genético de  $\beta$ -glucuronidasa.

**SEQ ID NO: 15** - secuencia de un grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión o EXP, EXP-CaMV.35S:1:1, que comprenden el promotor 35S y líder del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

**SEQ ID NO: 16** - secuencia de un grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión o EXP, EXP-

Os.Act1:1:1, que comprende el promotor, líder, e intrón de actina 1 del arroz.

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona moléculas de ADN que tienen una actividad genética reguladora beneficiosa para las especies vegetales, en la que las moléculas de ADN comprenden elementos reguladores. La invención también proporciona células vegetales, plantas, y semillas transgénicas que comprenden las moléculas de ADN. Las secuencias de nucleótidos de estas moléculas de polinucleótido se proporcionan como las SEQ ID NO: 1, 3, 6, y 8. El diseño, construcción, y uso de estas moléculas de ADN se desvelan en el presente documento. Estas moléculas de ADN son capaces, por ejemplo, de afectar la expresión de una molécula de nucleótido que se puede transcribir a la que se unen operativamente en los tejidos vegetales, y, por lo tanto, regular selectivamente la expresión genética o actividad de un producto genético codificado en plantas transgénicas. También se desvelan en el presente documento procedimientos de fabricación y utilización de los elementos reguladores, las construcciones de ADN que comprenden los promotores y/u otras secuencias de nucleótidos desveladas y los procedimientos para la preparación y utilización de los mismos. La invención también proporciona células vegetales, planta, y semillas transgénicas que comprenden los elementos reguladores unidos operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir, así como células huésped transformadas.

Las secuencias de ADN de acuerdo con la presente invención se proporcionan unidas operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir. La molécula de polinucleótido que se puede transcribir es heteróloga con respecto a la secuencia reguladora que se proporciona en el presente documento. Una secuencia de un elemento regulador comprendido en las moléculas de ADN de la invención está por lo tanto unida operativamente a una molécula de polinucleótido heteróloga que se puede transcribir.

Se proporcionan las siguientes definiciones y procedimientos para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos habitados en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos de que se señale otra cosa, los términos se tienen que entender de acuerdo con el uso convencional por los expertos habitados en la técnica relevante.

#### **Moléculas de ADN**

Como se utiliza en el presente documento, el término "ADN" o "molécula de ADN" se refiere a una molécula de ADN de cadena doble de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases de desoxirribonucleótidos o una molécula de polinucleótido, leída desde el extremo 5' (corriente arriba) hasta el extremo 3' (corriente abajo). Como se utiliza 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 se corresponde con la del Título 37 del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos § 1.822 y que se expone en las tablas de Referencia ST WIPO. 25 (1998), Apéndice 2, Tablas 1 y 3.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de ADN aislada" se refiere a una molécula de ADN separada al menos parcialmente de otras moléculas con las que se asocia normalmente en su estado nativo o natural. El término "aislada" se puede referir a una molécula de ADN que está separada al menos parcialmente de algunos de los ácidos nucleicos que flanquean normalmente la molécula de ADN en su estado nativo o natural. Por lo tanto, las moléculas de ADN fusionadas a secuencias reguladoras o codificantes con las que no se asocian normalmente, por ejemplo, como resultado de técnicas recombinantes, se consideran aisladas en el presente documento. Dichas moléculas se consideran aisladas cuando se integran en el cromosoma de una célula huésped o están presentes en una solución de ácidos nucleicos con otras moléculas de ADN, en la que no está en su estado nativo.

Se puede utilizar cualquiera de los procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para aislar y manipular una molécula de ADN, o fragmento de la misma, como se desvela en la presente invención. Por ejemplo, se puede utilizar la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una molécula de ADN de partida en particular y/o para producir variantes de la molécula original. Las moléculas de ADN, o fragmentos de las mismas, también se pueden obtener por otras técnicas, tales como sintetizando directamente el fragmento por medios químicos, como se practica comúnmente utilizando un sintetizador de oligonucleótidos automático.

Como se utiliza en el presente documento "identidad de secuencia" se refiere a la extensión en la que dos secuencias de polinucleótido alineadas óptimamente o dos secuencias de polipéptido alineadas óptimamente son idénticas. Un alineamiento óptimo de secuencias se crea mediante el alineamiento manual de dos secuencias, por ejemplo, una secuencia de referencia y otra secuencia, para maximizar el número de coincidencias de nucleótidos en el alineamiento de secuencias con inserciones, eliminaciones apropiadas de nucleótidos o huecos internos. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia proporcionada como las secuencias de polinucleótido de SEQ ID NO: 1, 3, 6, y 8.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "porcentaje de identidad de secuencia" o "% de identidad" es la fracción de identidad multiplicada por 100. La "fracción de identidad" para una secuencia alineada óptimamente con una secuencia de referencia es el número de coincidencias de nucleótidos en un alineamiento óptimo, dividido por el número total de nucleótidos en la secuencia de referencia, por ejemplo, el número total de nucleótidos en la secuencia de referencia completa o de longitud completa. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona una molécula

de ADN que comprende una secuencia que, cuando se alinea óptimamente con una secuencia de referencia, que se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 1, 3, 6 y 8, tiene al menos aproximadamente un 95 por ciento de identidad, al menos aproximadamente 96 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 97 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 98 por ciento de identidad, o al menos aproximadamente un 99 por ciento de identidad respecto a la secuencia de referencia. Dicha secuencia se define por que tiene actividad promotora.

### Elementos reguladores

Un elemento regulador es una molécula de ADN que tiene actividad genética reguladora, es decir, que tiene la capacidad de afectar la transcripción y/o traducción de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que se une operativamente. La expresión "actividad genética reguladora" se refiere por lo tanto a la capacidad de afectar el patrón de expresión de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que se une operativamente afectando la transcripción y/o traducción de esa molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que se une operativamente. Como se utiliza en el presente documento, un grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión (EXP) puede estar comprendido por elementos de expresión, tales como amplificadores, promotores, líderes, e intrones, unidos operativamente. Por lo tanto, el grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión puede estar comprendido, por ejemplo, por un promotor unido operativamente en 5' a una secuencia líder, que a su vez está unida operativamente en 5' a una secuencia de intrón. La secuencia de intrón puede estar comprendida por una secuencia de inicio en el punto de la unión del primer intrón/exón de corte y empalme de manera que se proporcione el procesamiento del intrón/exón apropiado para facilitar la transcripción y el procesamiento apropiado de la transcripción resultante. Los líderes e intrones pueden afectar positivamente la transcripción de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que están unidos operativamente, así como la traducción del ARN transcrito resultante. La molécula de ARN pre-procesada comprende líderes e intrones, que pueden afectar el procesamiento post-transcripcional del ARN transcrito y/o la exportación de la molécula de ARN transcrita desde el núcleo al citoplasma. A continuación del procesamiento transcripcional de la molécula de ARN transcrita, la secuencia líder se puede mantener como parte del ARN mensajero final y puede afectar positivamente la traducción de la molécula del ARN mensajero.

Los elementos reguladores tales como promotores, líderes, intrones, y regiones de terminación de la transcripción son moléculas de ADN que tienen actividad genética reguladora y forman una parte integral en la expresión total de los genes en las células vivas. La expresión "elemento regulador" se refiere a una molécula de ADN que tiene actividad genética reguladora, es decir, que tiene la capacidad de afectar la transcripción y/o traducción de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que se une operativamente. Los elementos reguladores aislados, tales como los promotores y líderes, que funcionan en plantas son por lo tanto útiles para la modificación de fenotipos vegetales mediante los procedimientos de modificación genética.

Los elementos reguladores se pueden caracterizar por sus efectos en el patrón de expresión (cualitativa y/o cuantitativamente), por ejemplo, efectos positivos o negativos y/o constitutivos u otros efectos, tales como por su patrón de expresión de respuesta temporal, espacial, de desarrollo, tisular, ambiental, fisiológico, patológico, de ciclo celular, y/o químico, y cualquier combinación de los mismos, así como mediante indicaciones cuantitativas o cualitativas. Un promotor puede ser útil como elemento regulador para la modulación de la expresión de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que se une operativamente.

Como se utiliza en el presente documento, un "patrón genético de expresión" 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 ARNm, ARNds, un ARNt, un ARNr y un ARNip.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "expresión proteica" es cualquier patrón de traducción de una molécula de ARN en una molécula proteica. La expresión proteica se puede caracterizar por sus cualidades temporal, espacial, del desarrollo, o morfológicas, así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas.

Como se utiliza 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 (factores actuantes trans de la transcripción) para iniciar la transcripción. Un promotor se puede aislar inicialmente a partir de la región no traducida 5' (5' UTR) de una copia genética de un gen. De manera alternativa, los promotores pueden ser moléculas de ADN producidas o modificadas sintéticamente. Los promotores también pueden ser quiméricos, es decir, un promotor producido mediante la fusión de dos o más moléculas heterólogas de ADN. Un promotor útil en la práctica de la presente invención incluye la SEQ ID NO: 2. Dichas moléculas y cualquier variante o derivada de las mismas se describen en el presente documento y se define adicionalmente como que comprende una actividad promotora, es decir, son capaces de actuar como un promotor en una célula huésped, tal como de una planta transgénica. En más realizaciones específicas adicionales, se puede definir un fragmento como que presenta la actividad promotora que posea la molécula promotora de partida de la que se deriva, o un fragmento puede comprender un "promotor mínimo" que proporciona un nivel básico de transcripción que está comprendido de una caja TATA o secuencia equivalente para el reconocimiento y unión del complejo ARN polimerasa II para el inicio de la transcripción.

Se desvelan en el presente documento, fragmentos de una secuencia promotora como se desvela en el presente documento. Los fragmentos de promotor pueden comprender una actividad promotora como se ha descrito anteriormente y pueden ser útiles solos o en combinación con otros promotores y fragmentos promotores, tal como en la construcción de promotores quiméricos. Los fragmentos de un promotor pueden comprender al menos aproximadamente 50, 95, 150, 250, 500, 750, o al menos aproximadamente 1000 nucleótidos contiguos, o más, de una molécula de polinucleótido que tiene una actividad promotora.

Se pueden producir composiciones derivadas del promotor presentado como SEQ ID NO: 2, tales como con eliminaciones internas o en 5', por ejemplo, utilizando procedimientos conocidos en la técnica para mejorar o alterar la expresión, incluyendo la eliminación de elementos que tengan efectos positivos o negativos sobre la expresión; la duplicación de elementos que tengan efectos positivos o negativos sobre la expresión; y/o duplicando o eliminando elementos que tengan efectos sobre la expresión específicos del tejido o la célula. Se pueden utilizar composiciones derivadas del promotor presentado como SEQ ID NO: 2, que comprendan eliminaciones en 3' en las que se han eliminado el elemento de caja TATA o una secuencia equivalente de la misma y la secuencia corriente abajo. Se pueden hacer eliminaciones adicionales para retirar cualquiera de los elementos que tengan efectos positivos o negativos; específicos del tejido; específicos de la célula; o temporales (tales como en ritmos circadianos) sobre la expresión. Se puede utilizar el promotor presentado como SEQ ID NO: 2 y fragmentos o amplificadores derivados del mismo para producir composiciones de elementos transcripcionales reguladores quiméricos que comprendan el promotor presentado como SEQ ID NO: 2 y los fragmentos o amplificadores derivados del mismo unidos operativamente a otros amplificadores y promotores. La eficacia de las modificaciones, duplicaciones o eliminaciones que se describen en el presente documento sobre los aspectos deseados de la expresión de un transgén en particular se pueden ensayar empíricamente en ensayos transitorios o estables con plantas, tales como se describen en los ejemplos de trabajo del presente documento, así como para validar los resultados, que pueden variar dependiendo de los cambios que se hagan y el objetivo del cambio en la molécula de partida.

Como se utiliza en el presente documento, el término "líder" se refiere a una molécula de ADN aislada a partir de una región no traducida 5' (5' UTR) de una copia genómica de un gen y que se define en general como un segmento de nucleótido entre el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y el sitio de inicio de la secuencia codificante de la proteína. De manera alternativa, los líderes pueden ser elementos de ADN producidos o modificados sintéticamente. Se puede utilizar un líder como elemento regulador 5' para la modulación de la expresión de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que está unido operativamente. Las moléculas líder se pueden utilizar como un promotor heterólogo o con su promotor nativo. Las moléculas promotoras desveladas en el presente documento pueden por lo tanto estar unidas operativamente a su líder activo o pueden estar unidas operativamente a un líder heterólogo. Un líder útil en la práctica de la presente invención se presenta como SEQ ID NO: 4. En realizaciones específicas, dichas secuencias se pueden definir como que son capaces de actuar como un líder en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo, una célula vegetal transgénica. Dichas secuencias pueden descifrarse como que tienen una actividad líder.

La secuencia líder (5' UTR) que se presenta como SEQ ID NO: 4 puede estar comprendida por elementos reguladores o puede adoptar estructuras secundarias que pueden tener un efecto sobre la transcripción o traducción de un transgén. Esta secuencia líder se puede utilizar para fabricar elementos reguladores quiméricos que afecten a la transcripción o traducción de un transgén. Además, la secuencia líder que se presenta como SEQ ID NO: 4 se puede utilizar para fabricar secuencias líderes quiméricas que afecten a la transcripción o traducción de un transgén.

La introducción de un gen ajeno en una nueva planta huésped no siempre da como resultado una alta expresión del gen introducido. Además, si se manejan rasgos complejos, a veces es necesario modular varios genes con diferentes patrones de expresión espacial o temporal. Los intrones pueden proporcionar principalmente dicha modulación. Sin embargo, múltiples usos La introducción de un gen ajeno en una nueva planta huésped no siempre da como resultado una alta expresión del gen introducido. Sin embargo, se ha demostrado que el uso múltiple del mismo intrón en una planta presenta desventajas. En esos casos, es necesario tener una colección de elementos de control básicos para construcción de elementos de ADN recombinante apropiados. El número de intrones que se sabe en la técnica que tienen propiedades potenciadoras de la expresión es limitado, y, por lo tanto, es necesario tener alternativas.

Las composiciones derivadas de cualquiera de los intrones presentados como SEQ ID NO: 5, 7 y 9 pueden estar comprendidas por eliminaciones o duplicaciones internas de elementos reguladores *cis*. Adicionalmente, se pueden utilizar alteraciones de las secuencias 5' y 3' que comprenden las uniones de intrón/corte y empalme de exón para mejorar la expresión o la especificidad de la expresión cuando se unen operativamente a un promotor + líder o promotor quimérico + líder y la secuencia codificante. Las alteraciones de las regiones 5' y 3' que comprenden la unión intrón/corte y empalme del exón también se pueden hacer para reducir el potencial de introducción de falsos codones de inicio y parada que se produce en la transcripción resultante después del procesamiento y corte y empalme del ARN mensajero. Los intrones se pueden ensayar empíricamente como se describe en los ejemplos de trabajo para determinar el efecto del intrón sobre la expresión de un transgén.

Un promotor o fragmento de promotor se puede analizar en cuanto a la presencia de elementos promotores conocidos, es decir, Características de la secuencia de ADN, tales como una caja TATA y otros motivos del sitio de unión del factor de transcripción. La identificación de dichos elementos promotores conocidos se puede utilizar por un experto en la técnica para diseñar variantes de un promotor que tengan un patrón de expresión similar al promotor original.

Como se utiliza en el presente documento, el término "amplificador" o "elemento amplificador" se refiere a un elemento transcripcional regulador actuante *cis* (un elemento *cis*), que transmite un aspecto del patrón de expresión total, pero que habitualmente es insuficiente por sí solo para dirigir la transcripción de una secuencia de polinucleótido unida operativamente. A diferencia de los promotores, los elementos amplificadores no incluyen habitualmente un sitio de inicio de la transcripción (TSS) o caja TATA o secuencia equivalente. Un promotor puede comprender naturalmente uno o más elementos amplificadores que afectan a la transcripción de una secuencia de polinucleótido unida operativamente. Un elemento amplificador aislado puede fusionarse también con un promotor para producir un elemento *cis* promotor quimérico, que transmite un aspecto de la modulación total de la expresión genética. Un promotor o fragmento de promotor puede comprender uno o más elementos amplificadores que afectan a la transcripción de genes unidos operativamente. Se cree que muchos elementos promotores amplificadores se unen a una proteína de unión al ADN y/o afectan la topología del ADN, produciendo conformaciones locales que permiten o restringen selectivamente el acceso de la ARN polimerasa a la matriz de ADN, o que facilitan selectivamente la apertura de la doble hélice en el sitio de inicio de la transcripción. Un elemento amplificador puede funcionar para unir factores de transcripción que regulan la transcripción. Algunos elementos amplificadores se unen a más de un factor de transcripción, y los factores de transcripción pueden interactuar con diferentes afinidades como más de un dominio amplificador. Los elementos amplificadores se pueden identificar por varias técnicas, incluyendo análisis de eliminación, es decir, eliminación de uno o más nucleótidos desde el extremo 5' o interno hasta un promotor; análisis de las proteínas de unión a ADN utilizando la huella de DNasa I, interferencia por metilación, ensayos de cambio de movilidad en electroforesis, huella genómica *in vivo* mediante PCR mediada por ligadura, y otros ensayos convencionales; o mediante similitud de secuencia de ADN utilizando los motivos de elementos *cis* conocidos o elementos amplificadores como secuencia diana o motivo diana con procedimientos de comparación de secuencias de ADN convencionales, tales como BLAST. La estructura fina de un dominio amplificador se puede estudiar adicionalmente mediante mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o mediante otros procedimientos convencionales. Los elementos amplificadores se pueden obtener mediante síntesis química o mediante el aislamiento de los elementos reguladores que incluyen dichos elementos y se pueden sintetizar con nucleótidos flanqueantes adicionales que contienen sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar la modificación posterior.

En las plantas, la inclusión de algunos intrones en las construcciones genéticas da lugar a un aumento del ARNm y la acumulación con respecto a las construcciones que carecen del intrón. Este efecto se ha denominado "aumento mediado por el intrón" (IME) de la expresión genética (Mascarenhas y col., (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:913-920). Los intrones conocidos que estimulan la expresión en las plantas se han identificado en los genes de maíz [por ejemplo, *tubA1*, *Adh1*, *Sh1*, *Ubi1* (Jeon y col., *Plant Physiol.* 123:1005-1014, 2000; Callis y col., *Genes Dev.* 1:1183-1200, 1987; Vasil y col., *Plant Physiol.* 91:1575-1579, 1989; Christiansen y col., *Plant Mol. Biol.* 18:675-689, 1992) y genes de arroz (por ejemplo, *sal*, *tpi*: McElroy y col., *Plant Cell* 2:163-171, 1990; Xu y col., *Plant Physiol.* 106:459-467, 1994). De manera similar, se ha descubierto que los intrones de los genes de plantas dicotiledóneas tales como la petunia (por ejemplo, *rbcS*), patata (por ejemplo, *st-1s1*) y *Arabidopsis thaliana* (por ejemplo, *ubq3* y *pat1*) elevan las tasas de expresión genética (Dean y col., *Plant Cell* 1:201-208, 1989; Leon y col., *Plant Physiol.* 95:968-972, 1991; Norris y col., *Plant Mol Biol* 21:895-906, 1993; Rose y Last, *Plant J.* 11:455-464, 1997). Se ha demostrado que las eliminaciones o mutaciones dentro de los sitios de corte y empalme de un intrón reduce la expresión genética, indicando que el corte y empalme puede ser necesario para el IME (Mascarenhas y col., *Plant Mol Biol.* 15:913-920, 1990; Clancy y Hannah, *Plant Physiol.* 130:918-929, 2002). Sin embargo, dicho corte y empalme no es necesario para ciertos IME en plantas dicotiledóneas, como se demuestra mediante mutaciones puntuales dentro de los sitios de corte y empalme del gen *pat1* de *A. thaliana* (Rose y Beliakoff, *Plant Physiol.* 122:535-542, 2000).

El aumento de la expresión genética por los intrones no es un fenómeno general debido que algunas inserciones de intrones en los casetes de expresión recombinantes han fallado en aumentar la expresión (por ejemplo, los intrones de los genes de dicotiledóneas tales como el gen *rbcS* del guisante, el gen *faseolina* de la judía, y el gen *st1s-1* de la *Solanum tuberosum*), y los intrones de genes de maíz (el noveno intrón del gen *adh1*, y el primer intrón del gen *hsp81*) (Chee y col., *Gene* 41:47-57, 1986; Kuhlmeier y col., *Mol Gen Genet* 212:405-411, 1988; Mascarenhas y col., *Plant Mol. Biol.* 15:913-920, 1990; Sinibaldi y Mettler, En WE Cohn, K Moldave, eds, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol 42. Academic Press, New York, pp 229-257, 1992; Vancanneyt y col., *Mol. Gen. Genet.* 220:245-250, 1990). Por lo tanto, no se puede emplear cualquier intrón para modificar el nivel de expresión genética de genes no endógenos o genes endógenos en plantas transgénicas. Las características o distintivos específicos de la secuencia que deben estar presentes en una secuencia de intrón con el fin de aumentar la tasa de expresión de un gen determinado no se conocían en la técnica anterior, y por lo tanto no es posible predecir si un intrón vegetal determinado, cuando se utiliza de manera heteróloga, producirá un IME.

Como se utiliza en el presente documento, el término "quimérico" se refiere a una única molécula de ADN producida fusionando una primera molécula de ADN a una segunda molécula de ADN, en el que ni la primera ni la segunda molécula de ADN se encontraría normalmente en esa configuración, es decir, fusionada una con otra. La molécula de ADN quimérica es por lo tanto una nueva molécula de ADN no encontrada de otra manera normalmente en la naturaleza. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "promotor quimérico" se refiere a un promotor producido mediante dicha modificación de moléculas de ADN. Un promotor quimérico puede combinar dos o más fragmentos de ADN, por ejemplo, la fusión de un promotor a un elemento amplificador.

Como se utiliza en el presente documento, el término "variante" se refiere a una segunda molécula de ADN que es similar en composición, pero no idéntica a, una primera molécula de ADN, y la segunda molécula de ADN aún mantiene

la funcionalidad general, es decir, el mismo o similar patrón de expresión, de la primera molécula de ADN. Una variante puede ser una versión más corta o truncada de la primera molécula de ADN, tal como con sitios diferentes de enzimas de restricción y/o eliminaciones, sustituciones y/o inserciones internas. Una "variante" puede englobar también un elemento regulador que tenga una secuencia de nucleótidos que comprenda una sustitución, eliminación, y/o inserción de uno o más nucleótidos de una secuencia de referencia, en el que el elemento regulador derivado tiene más o menos o una actividad transcripcional o traduccional equivalente que la molécula reguladora parental correspondiente. Las "variantes" de elementos reguladores también englobarán variantes que aparecen por mutaciones que se producen naturalmente en la transformación celular de bacterias y plantas. En la presente invención, se puede unir una secuencia de polinucleótido proporcionada como SEQ ID NO: 1, 3, 6 y 8 para crear variantes que sean similares en composición, pero no idénticas a la secuencia de polinucleótido de elemento regulador original, mientras que aún mantenga la funcionalidad general, es decir, el mismo patrón de expresión o similar, que el elemento regulador original. La producción de dichas variantes de la presente invención está en el nivel del experto habituado en la divulgación. Las "variantes" de elementos reguladores quiméricos comprenden los mismos elementos constituyentes que una secuencia de referencia, pero los elementos constituyentes que comprenden el elemento regulador quimérico puede estar unido operativamente mediante distintos procedimientos conocidos en la técnica, tales como digestión por enzimas de restricción, y clonación independiente de la ligadura, ensamblaje modular de productos de PCR durante la amplificación, o síntesis química directa del elemento regulador, así como otros procedimientos conocidos en la técnica. La "variante" de elemento regulador resultante puede estar comprendida por los mismos, o variantes de los mismos elementos constituyentes de la secuencia de referencia, pero se diferencia en la secuencia o secuencias que comprenden la secuencia de unión o secuencias que permitan que las partes constituyentes estén unidas operativamente. En la presente invención, se puede unir una secuencia de polinucleótido proporcionada como SEQ ID NO: 1, 3, 6 y 8 proporciona una secuencia de referencia en la que los elementos constituyentes que comprenden la secuencia de referencia se pueden unir por procedimientos conocidos en la técnica y pueden comprender sustituciones, eliminaciones, y/o inserciones de uno o más nucleótidos o mutaciones que se producen naturalmente en la transformación de células bacterianas y de plantas.

### Construcciones

Como se utiliza en el presente documento, el término "construcción" significa cualquier molécula de polinucleótido recombinante tal como un plásmido, cósmido, virus, molécula de polinucleótido de replicación autónoma, fago, o molécula de polinucleótido de ADN o ARN de cadena doble o cadena sencilla lineal o circular, derivada de cualquier fuente, capaz de la integración genómica o la replicación autónoma, que comprende una molécula de polinucleótido, donde una o más moléculas de polinucleótido se ha unido de una manera funcionalmente operativa, es decir, están unidas operativamente. Como se utiliza en el presente documento, el término "vector" significa cualquier construcción de polinucleótido recombinante que se puede utilizar con fines de transformación, es decir, la introducción de un ADN heterólogo en una célula huésped. Un vector puede incluir un casete de expresión o casete transgénico aislado de cualquiera de las moléculas mencionadas anteriormente. Los casetes de expresión o casetes transgénicos útiles están comprendidos por grupos de elementos transcripcionales reguladores de la expresión ("EXP") presentados como SEQ ID NO: 1, 6 u 8 unidos operativamente a una secuencia codificante heteróloga que está unida operativamente a las 3' UTR presentadas como SEQ ID NO: 10, 11, 12, o 13.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "unida operativamente" se refiere a una primera molécula unida a una segunda molécula, en el que las moléculas se disponen de manera que la primera molécula afecta la función de la segunda molécula. Las dos moléculas pueden ser parte o no de una única molécula contigua y puede ser adyacentes o no. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir si el promotor modula la transcripción de la molécula de polinucleótido de interés que se puede transcribir en una célula. Un líder, por ejemplo, está unido operativamente a una secuencia codificante cuando es capaz de servir de líder al polipéptido codificado por la secuencia codificante.

Las construcciones desveladas en el presente documento incluyen construcciones de ADN plasmídico Ti de doble límite que tienen una región limítrofe derecha (RB o AGRtu.RB) y limítrofe izquierda (LB o AGRtu.LB) del plásmido Ti aislado de *Agrobacterium tumefaciens* que comprende un T-ADN, que junto con las moléculas de transferencia proporcionadas por las células de *A. tumefaciens* permiten la integración del T-ADN en el genoma de una célula vegetal (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 6.603.061). Las construcciones también pueden contener segmentos de ADN de la matriz plasmídica que proporcionen la función de replicación y la selección por antibióticos en células bacterianas, por ejemplo, un origen de replicación en *Escherichia coli* tal como *ori322*, un origen de replicación con un intervalo de huéspedes amplio tal como *oriV* u *oriRi*, y una región codificante para un marcador genético tal como Spec/Strp que codifica una Tn7 aminoglicósido adeniltransferasa (*aadA*) que transmite resistencia a la espectinomicina o la estreptomycinina, o un marcador genético de gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación en plantas, la cepa bacteriana huésped a menudo es ABI, C58, o LBA4404 de *A. tumefaciens*; sin embargo, pueden funcionar otras cepas conocidas por los expertos en la técnica de transformación de plantas.

Se conocen procedimientos en la técnica para ensamblar e introducir construcciones en una célula de manera que la molécula de polinucleótido que se puede transcribir se transcribe en una molécula de ARNm funcional que se traduce y expresa como un producto proteico. Para la práctica de la presente invención, las composiciones y procedimientos para la preparación y utilización de las construcciones y las células huésped son bien conocidas por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición Volúmenes 1, 2, y 3, J. Sambrook,

D.W. Russell, y N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000). Los procedimientos para fabricar vectores recombinantes particularmente adecuados para la transformación de plantas incluyen los descritos en las Patentes de EE. UU. 4.971.908; 4.940.835; 4.769.061; y 4.757.011. Estos tipos de vectores también se han revisado en la bibliografía científica (véase, por ejemplo, Rodriguez, y col., Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston, 1988; y Glick y col., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, FL., 1993). Los vectores típicos útiles para la expresión de ácidos nucleicos en plantas superiores se conocen bien en la técnica e incluyen vectores derivados del plásmido inductor de tumores (Ti) de *A. tumefaciens* (Rogers y col., Methods in Enzymology 153: 253-277, 1987). Otros vectores recombinantes útiles para la transformación de plantas, incluyendo el vector de control de transferencia pCAMVCN, también se han descrito en la bibliografía científica (véase, por ejemplo, Fromm y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5824-5828, 1985).

Se pueden incluir distintos elementos reguladores en una construcción, incluyendo cualquiera de los que se proporcionan en el presente documento. Cualquiera de estos elementos reguladores puede proporcionarse en combinación con otros elementos reguladores. Dichas combinaciones se pueden diseñar o modificar para producir las características reguladoras deseables. Las construcciones desveladas en el presente documento pueden comprender al menos un elemento regulador unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir unida operativamente a una molécula de terminación de la transcripción en 3'.

Las construcciones pueden incluir cualquier promotor o líder que se proporciona en el presente documento o se conozca en la técnica. Por ejemplo, un promotor puede estar unido operativamente a un líder no traducido 5' heterólogo tal como uno derivado de un gen de la proteína de choque térmico (véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. 5.659.122 y 5.362.865). De manera alternativa, un líder puede estar unido operativamente a un promotor heterólogo tal como el promotor de transcripción 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Véase, Patente de EE. UU. 5.352.605).

Como se utiliza en el presente documento, el término "intrón" se refiere a una molécula de ADN que se puede aislar o identificar de una copia genómica de un gen y se puede definir en general como una región recortada durante el procesamiento del ARNm antes de la traducción. De manera alternativa, un intrón puede ser un elemento de ADN producido o modificado sintéticamente. Un intrón puede contener elementos amplificadores que efectúen la transcripción de genes unidos operativamente. Un intrón se puede utilizar como elemento regulador para la modulación de la expresión de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que está unido operativamente. Una construcción de ADN puede comprender un intrón, y el intrón puede ser heterólogo o no con respecto a la secuencia de la molécula de polinucleótido que se puede transcribir. Ejemplos de intrones en la técnica, incluyen el intrón de actina del arroz (Patente de EE. UU. 5.641.876) y el intrón HP70 del maíz (Patente de EE. UU. 5.859.347). Los intrones útiles en la práctica de la presente invención incluyen la SEQ ID NO: 5, 7, y 9. Adicionalmente, cuando se modifican las secuencias limítrofes intrón/exón, puede ser preferible evitar la utilización de 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, inmediatamente después del extremo 3' del sitio de corte y empalme (AG) para eliminar el potencial de formación de codones de inicio no deseados durante el procesamiento del ARN mensajero en la transcripción final. La secuencia alrededor de los sitios de unión de los extremos 5' o 3' de corte o empalme del intrón se pueden modificar entonces de esta manera.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de terminación de la transcripción 3'" o "3' UTR" se refiere a una molécula de ADN que se utiliza durante la transcripción para producir una región no traducida en 3' (3' UTR) de una molécula de ARNm. La región no traducida 3' de una molécula de ARNm puede generarse mediante escisión específica y poliadenilación 3' (cola poliA). Una 3' UTR puede estar unida operativamente a y localizarse corriente debajo de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir y puede incluir polinucleótidos que proporcionan una señal de poliadenilación y otras señales reguladoras capaces de afectar a la transcripción, el procesamiento del ARNm, o la expresión genética. Se cree que las colas poliA funcionan en la estabilidad del ARNm y en el inicio de la traducción. Ejemplos de moléculas de terminación de la transcripción en 3' de la técnica son la región 3' de nopalina sintasa (véase, Fraley, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4803-4807, 1983); la región 3' de hsp17 del trigo; región 3' de la subunidad pequeña de rubisco del guisante; región 3' de E6 del algodón (Patente de EE. UU. 6.096.950); regiones 3' desveladas en el documento WO/0011200; y la 3' UTR de coixina (Patente de EE. UU. 6.635.806).

La utilización de las 3' UTR es beneficioso para la expresión recombinante de genes específicos. En los sistemas animales, la maquinaria de las 3' UTR está bien definida (por ejemplo, Zhao y col., Microbiol Mol Biol Rev 63:405-445, 1999; Proudfoot, Nature 322:562-565, 1986; Kim y col., Biotechnology Progress 19:1620-1622, 2003; Yonaha y Proudfoot, EMBO J. 19:3770-3777, 2000; Cramer y col., FEBS Letters 498:179-182, 2001; Kuerstem y Goodwin, Nature Reviews Genetics 4:626-637, 2003). La terminación de la transcripción de ARN eficaz es necesaria para evitar la transcripción no deseada de secuencias (corriente abajo) no relacionadas con el rasgo, que interfieran con la actuación del rasgo. La disposición de múltiples casetes de expresión genética en proximidad local entre ellas (por ejemplo, dentro de un T-ADN) puede producir la supresión de la expresión genética de uno o más genes en dicha construcción en comparación con inserciones independientes (Padidam y Cao, BioTechniques 31:328-334, 2001). Esto pueden interferir con la consecución de adecuados niveles de expresión, por ejemplo, en casos en los que se desee una fuerte expresión genética de todos los casetes.

En las plantas, no se conocen secuencias de señales de poliadenilación definidas claramente. Hasegawa y col. (Plant J. 33:1063-1072, 2003) no fueron capaces de identificar secuencias de la señal de poliadenilación conservada tanto en sistemas *in vitro* e *in vivo* en *Nicotiana sylvestris* y para determinar la longitud actual de la transcripción primaria (no poliadenilada). Una 3' UTR débil puede generar una translectura, que puede afectar la expresión de los genes localizados en los casetes de expresión vecinos (Padidam y Cao, BioTechniques 31:328-334, 2001). El control apropiado de terminación de la transcripción puede prevenir la translectura en secuencias (por ejemplo, otros casetes de expresión) localizadas corriente abajo y pueden permitir el reciclado eficaz de ARN polimerasa II del ADN para mejorar la expresión genética. La terminación eficaz de la transcripción (liberación de ARN polimerasa II del ADN) es un prerrequisito para el reinicio de la transcripción y de esta manera afecta el nivel de transcripción total. Posteriormente a la terminación de la transcripción, el ARNm maduro se libera del sitio de síntesis y se transporta al citoplasma. Los ARNm de eucariotas se acumulan como formas poli(A) *in vivo*, haciendo difícil detectar los sitios de terminación transcripcional por procedimientos convencionales. Sin embargo, la predicción de 3' UTR funcionales y eficaces mediante procedimientos bioinformáticos es difícil ya que son secuencias que no se conservan para hacer posible la predicción fácil de una 3' UTR eficaz.

Desde el punto de vista práctico, puede ser beneficioso que una 3' UTR que se utilice en un casete transgénico posee ciertas características. Por ejemplo, una 3' UTR útil de acuerdo con la presente invención puede terminar eficiente y eficazmente la transcripción del transgén y evita la translectura de la transcripción en cualquiera secuencia de ADN vecina, que puede estar comprendida por otro casete transgénico, como en el caso de múltiples casetes que residen en un T-ADN, o en la vecindad del ADN cromosómico en la que se inserta el T-ADN. La 3' UTR óptimamente no debería producir una reducción de la actividad transcripcional transmitida por el promotor, líder e intrones que se utilizan para dirigir la expresión del transgén. En la biotecnología de plantas, la 3' UTR a menudo se utiliza para cebar las reacciones de amplificación del ARN transcrito inversamente extraído de la planta transformada y puede utilizarse para (1) evaluar la actividad transcripcional o la expresión del casete transgénico una vez que se integra en el cromosoma de la planta; (2) evaluar el número de copias de inserciones dentro del ADN de la planta; y (3) evaluar la cigosidad de la semilla resultante después del cruzamiento. La 3' UTR también se puede utilizar en las reacciones de amplificación del ADN extraído de la planta transformada para caracterizar que el casete insertado está intacto.

Las 3' UTR útil en la provisión de la expresión de un transgén en plantas se puede identificar basándose en la expresión de secuencias marcadoras expresadas (EST) en bibliotecas de ADNc fabricadas a partir del ARNm aislado de las semillas, flores, o cualquier otro tejido derivado de, por ejemplo, cola de zorro (*Andropogon gerardii*), carricera [*Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*)], almorejo (*Setaria viridis*), Teosinte (*Zea mays* subesp. *mexicana*), mijo cola de zorro (*Setaria italica*), o lágrima de Job (*Coix lacryma-jobi*). Utilizando los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, se puede fabricar bibliotecas de ADNc a partir de los tejidos de una especie vegetal utilizando tejidos florales, semillas, hojas, raíces u otros tejidos vegetales. Los ADNc resultantes se secuenciaron utilizando distintos procedimientos de secuenciación conocidos en la técnica. Los ETS resultantes se ensamblan en agrupamientos utilizando un software bioinformático tal como el *clc\_ref\_assemble\_complete* versión 2.01.37139 (CLC bio USA, Cambridge, Massachusetts 02142). La abundancia de transcripción de cada agrupamiento se determina contando el número de lecturas de ADNc para cada agrupamiento. Las 3' UTR identificadas pueden estar comprendidas por una secuencia derivada de la secuencia de ADNc, así como la secuencia derivada del ADN genómico. Se puede utilizar una secuencia de ADNc para diseñar cebadores, que se pueden utilizar en las bibliotecas de GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) construidas siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 3' de la secuencia de ADN genómico correspondiente para proporcionar una secuencia de terminación más larga. El análisis de la cantidad de transcripción relativa sea por recuento directo o recuentos normalizados de lecturas de secuencia observadas para cada biblioteca de tejido se puede utilizar para deducir las propiedades acerca de los patrones de expresión. Por ejemplo, algunas 3' UTR se pueden encontrar en transcripciones más abundantes en el tejido radical que foliar. Esto sugiere que la transcripción se expresa altamente en la raíz y que las propiedades de la expresión radical se pueden atribuir a la regulación transcripcional del promotor, el líder, los intrones o la 3' UTR. El ensayo empírico de las 3' UTR identificadas por las propiedades de expresión dentro de órganos, tejidos o tipo celulares específicos puede dar como resultado la identificación de 3' UTR que aumentan la expresión en esos órganos, tejidos, o tipos celulares específicos. Las 3' UTR útiles en la práctica de la presente invención se presentan como SEQ ID NO: 10, 11, 12, y 13.

Las construcciones y vectores también pueden incluir una secuencia codificante de un péptido de tránsito que expresa un péptido unido que es útil para el direccionamiento de un producto proteico, particularmente a un cloroplasto, leucoplasto y otro orgánulo plastídico; mitocondria, peroxisoma, vacuola; o una localización extracelular. Para las descripciones del uso de los péptidos de tránsito a los cloroplastos, véase las Patentes de EE. UU. 5.188.642 y 5.728.925. Muchas proteínas localizadas en los cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares como precursoras y se dirigen al cloroplasto mediante un péptido de tránsito al cloroplasto (CTP). Ejemplos de dichas proteínas del cloroplasto aisladas incluyen los que se asocian con la subunidad pequeña (SSU) de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina óxidorreductasa, la proteína I y la proteína II del complejo cosecha-luz, tiorredoxina F, enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS), y los péptidos de tránsito descritos en la Patente de EE. UU. 7.193.133. Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que las proteínas no cloroplásticas se pueden dirigir al cloroplasto mediante el uso de proteínas de fusión con un CTP heterólogo y que el CTP es suficiente para dirigir una proteína al cloroplasto. Se ha demostrado que la incorporación de un péptido de tránsito al cloroplasto adecuado tal como el EPSPS CTP (CTP2) de *Arabidopsis thaliana* (véase, Klee y col., Mol. Gen. Genet. 210:437-442, 1987) o el EPSPS

CTP (CTP4) de *Petunia hybrida* (véase, della-Cioppa y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6873-6877, 1986) dirige las secuencias proteicas de EPSPS heterólogas a los cloroplastos en plantas transgénicas (véase, las Patentes de EE. UU. 5.627.061; 5.633.435; y 5.312.910; y los documentos EP 0218571; EP 189707; EP 508909; y EP 924299).

#### **Moléculas de polinucleótido que se pueden transcribir**

5 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de polinucleótido que se puede transcribir" se refiere a cualquier molécula de ADN capaz de ser transcrita en una molécula de ARN, incluyendo las que tienen secuencias codificantes de proteínas y las que producen moléculas de ARN que tienen secuencias útiles para la supresión genética. Un "transgén" se refiere a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga respecto a la célula huésped al menos con respecto a su localización en el genoma y/o a una molécula de polinucleótido que se  
10 puede transcribir incorporada artificialmente al genoma de una célula huésped en la generación o actual o cualquiera anterior de la célula.

Un promotor comprendido en las moléculas de ADN de la presente invención está unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que es heteróloga con respecto a la molécula de promotor. Como se utiliza en el presente documento, el término "heterólogo" se refiere a la combinación de dos o más moléculas de polinucleótido cuando dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, las dos moléculas se pueden derivar de diferentes especies y/o las dos moléculas se pueden derivar de diferentes genes, por ejemplo, diferentes genes de la misma especie, o los mismos genes de diferentes especies. Un promotor es por lo tanto heterólogo con respecto a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir a la que se une operativamente si dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza, es decir, que la molécula de polinucleótido que se puede transcribir no se encuentra naturalmente unida operativamente a la molécula de promotor.  
15

La molécula de polinucleótido que se puede transcribir puede ser en general cualquier molécula de ADN de al que se desee una transcripción en ARN. Dicha expresión de una transcripción de ARN puede dar como resultado la traducción de la molécula de ARNm resultante y por tanto la expresión proteica. De manera alternativa, por ejemplo, una molécula de polinucleótido que se puede transcribir puede diseñarse para a producir en último término una disminución de la expresión de un gen o proteína específica. Esto se puede conseguir utilizando una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que se oriente en dirección antisentido. Un experto habituado en la técnica está familiarizado con la utilización de dicha tecnología antisentido. En resumen, según se transcribe la molécula de polinucleótido que se puede transcribir antisentido, el producto de ARN se hibrida y secuestra una molécula de ARN complementaria dentro de la célula. Esta molécula de ARN doble no se puede traducir en una proteína mediante la maquinaria de traducción celular y se degrada por la célula. Cualquier gen se puede regular negativamente de esta manera.  
20

Por lo tanto, una molécula de ADN proporcionada como la SEQ ID NO: 1, 3, 6 y 8, está unida operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir con el fin de modular la transcripción de la molécula de polinucleótido que se puede transcribir a un nivel deseado o en un patrón deseado cuando la construcción se integra en el genoma de una célula vegetal. La molécula de polinucleótido que se puede transcribir p puede comprender una región codificante de proteína de un gen, y el promotor afecta la transcripción de una molécula de ARN que se traduce y se expresa como un producto proteico. De manera alternativa, la molécula de polinucleótido que se puede transcribir puede comprender una región antisentido de un gen, y el promotor afecta la transcripción de una molécula de ARN antisentido, ARN de doble cadena u otra molécula de ARN inhibidora similar con el fin de inhibir la expresión de una molécula de ARN específica de interés en una célula huésped diana.  
25

#### **40 Genes de interés agronómico**

Las moléculas de polinucleótido que se pueden transcribir comprendidas en las moléculas de ADN de la presente invención pueden ser genes de interés agronómico. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "gen de interés agronómico" se refiere a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que, cuando se expresa en un tejido, células o tipo celular particular, transmite una característica deseable, tal como una asociada con la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo, rendimiento, producción, perfil nutricional, resistencia a enfermedades y plagas, y/o tolerancia ambiental o química en la planta. Los genes de interés agronómico incluyen los que codifican una proteína de rendimiento, una proteína de resistencia al estrés, una proteína de control del desarrollo, una proteína de diferenciación tisular, una proteína meristemática, una proteína de respuesta ambiental, una proteína de senescencia, una proteína de respuesta a hormonas, una proteína de abscisión, una proteína fuente, una proteína de fijación en la tierra, una proteína de control de floración, una proteína de semillas, una proteína de resistencia a herbicidas, una proteína de resistencia a las enfermedades, una enzima biosintética de ácidos grasos, una enzima biosintética de tocoferol, una enzima biosintética de aminoácidos, una proteína plaguicida, o cualquier otro agente, tal como una molécula de ARNi o antisentido que se dirige contra un gen en particular para su supresión. El producto de un gen de interés agronómico puede actuar dentro de la planta con el fin de afectar la fisiología o el metabolismo de la planta o puede actuar como un agente plaguicida en la dieta de una plaga que se alimenta en la planta.  
30

En una realización de la presente invención, se incorpora un promotor en una construcción de manera que el promotor está unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que es un gen de interés agronómico. La expresión del gen de interés agronómico es deseable con el fin de transmitir un rasgo agronómicamente beneficioso. Un rasgo agronómico beneficioso puede incluir, por ejemplo, tolerancia a herbicidas,  
35

control de insectos, rendimiento modificado, resistencia a enfermedades fúngicas, resistencia a virus, resistencia a nematodos, resistencia a enfermedades bacterianas, crecimiento y desarrollo de la planta, producción de almidón, producción modificada de aceites, alta producción de aceites, modificación del contenido de ácidos grasos, alta producción proteica, maduración de frutos, aumento de la nutrición animal y humana, biopolímeros, resistencia al estrés ambiental, péptidos farmacéuticos y péptidos secretables, mejora de los rasgos de procesamiento, mejora de la digestibilidad, producción enzimática, sabor, fijación del nitrógeno, producción de semillas híbridas, producción de fibra, y producción de biocombustible, entre otros. Ejemplos de los genes de interés agronómico conocidos en la técnica incluyen los de resistencia a herbicidas (Patentes de EE. UU. 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), aumento del rendimiento (Patentes de EE. UU. 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), control de insectos (Patentes de EE. UU. 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), resistencia a enfermedades fúngicas (Patentes de EE. UU. 6.653.280; 6.828.475; 6.822.141; 6.770.465; 6.215.048; 5.516.671; 5.773.696; 6.121.436; 6.316.407; y 6.506.962), resistencia a virus (Patentes de EE. UU. 6.617.496; 6.608.241; 6.015.940; 6.013.864; 5.850.023; y 5.304.730), resistencia a nematodos (Patente de EE. UU. 6.228.992), resistencia a enfermedades bacterianas (Patente de EE. UU. 5.516.671), crecimiento y desarrollo de la planta (Patentes de EE. UU. 6.723.897 y 6.518.488), producción de almidón (Patentes de EE. UU. 6.538.181; 6.538.179; 6.538.178; 5.750.876; y 6.476.295), modificación de la producción de aceite (Patentes de EE. UU. 6.444.876; 6.426.447; y 6.380.462), alta producción de aceites (Patentes de EE. UU. 6.495.739; 5.608.149; 6.483.008; y 6.476.295), modificación del contenido de ácidos grasos (Patentes de EE. UU. 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), alta producción de proteínas (Patente de EE. UU. 6.380.466), maduración de frutos (Patente de EE. UU. 5.512.466), aumento de la nutrición animal y humana (Patentes de EE. UU. 6.723.837; 6.653.530; 6.5412.59; 5.985.605; y 6.171.640), biopolímeros (Patentes de EE. UU. USRE37.543; 6.228.623; 5.958.745; y 6.946.588), resistencia al estrés ambiental (Patente de EE. UU. 6.072.103), péptidos farmacéuticos y péptidos secretables (Patentes de EE. UU. 6.812.379; 6.774.283; 6.140.075; y 6.080.560), mejora de rasgos de procesamiento (Patente de EE. UU. 6.476.295), mejora de la digestibilidad (Patente de EE. UU. 6.531.648) bajo contenido en rafinosa (Patente de EE. UU. 6.166.292), producción industrial de enzimas (Patente de EE. UU. 5.543.576), mejora del sabor (Patente de EE. UU. 6.011.199), fijación de nitrógeno (Patente de EE. UU. 5.229.114), producción de semillas híbridas (Patente de EE. UU. 5.689.041), producción de fibra (Patentes de EE. UU. 6.576.818; 6.271.443; 5.981.834; y 5.869.720) y producción de biocombustible (Patente de EE. UU. 5.998.700).

De manera alternativa, un gen de interés agronómico puede afectar las características o fenotipo de la planta mencionados anteriormente codificando una molécula de ARN que produzca la modulación dirigida de la expresión genética de un gen endógeno, por ejemplo, mediante antisentido (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 5.107.065); un ARN inhibidor ("ARNi", que incluye la modulación de la expresión genética mediante mecanismos mediados por miARN, ARNip, ARNip actuante trans, y sARN de fase, por ejemplo, como se describe en las solicitudes publicadas US 2006/0200878 y US 2008/0066206, y en US 2009/0070898); o mecanismos mediados por co-supresión. El ARN puede ser también una molécula de ARN catalítica (por ejemplo, una ribozima o un ribointerruptor; véase, por ejemplo, el documento US 2006/0200878) modificado para escindir un producto de ARNm endógeno. Por lo tanto, cualquier molécula de polinucleótido que se puede transcribir que codifique una molécula de ARN transcrita que afecte a un fenotipo agronómicamente importante o cambio morfológico de interés puede ser útil para la práctica de la presente invención. Se conocen procedimientos en la técnica para la construcción y la introducción de construcciones en una célula de manera que la molécula de polinucleótido que se puede transcribir se transcribe en una molécula que sea capaz de producir supresión genética. Por ejemplo, se desvela la supresión genética postranscripcional utilizando una construcción con una molécula de polinucleótido que se puede transcribir orientada en antisentido para regular la expresión en células vegetales en las Patentes de EE. UU. 5.107.065 y 5.759.829, y la supresión genética postranscripcional utilizando una construcción con una molécula de polinucleótido que se puede transcribir orientada en sentido para regular la expresión en células vegetales se desvela en las Patentes de EE. UU. 5.283.184 y 5.231.020. La expresión de un polinucleótido que se puede transcribir en una célula vegetal también se puede utilizar para suprimir las plagas de plantas que se alimentan de la célula vegetal, por ejemplo, las composiciones aisladas de plagas de coleópteros (Publicación de Patente de EE. UU. US20070124836) y composiciones aisladas de plagas de nematodos (Publicación de Patente de EE. UU. US20070250947). Las plagas de las plantas incluyen las plagas de artrópodos, plagas de nematodos, y plagas fúngicas o microbianas. Las moléculas de polinucleótido que se pueden transcribir ejemplares para la incorporación en construcciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, las moléculas de ADN o genes de una especie distinta de la especie o genes diana que se originan o están presentes en la misma especie, pero se incorporan en células receptoras por procedimientos de modificación genética más que por reproducción clásica o técnicas de cruzamiento. El tipo de molécula de polinucleótido puede incluir una molécula de polinucleótido que ya está presente en la célula vegetal, una molécula de polinucleótido de otra planta, una molécula de polinucleótido de un organismo diferentes, o una molécula de polinucleótido generada externamente, tal como una molécula de polinucleótido que contenga un mensaje antisentido de un gen, o una molécula de polinucleótido que codifique un transgén artificial, sintético o una versión modificada de otra manera.

### Marcadores genéticos

Como se utiliza en el presente documento, el término "marcador" se refiere a cualquier molécula de polinucleótido que se puede transcribir cuya expresión, o falta de la misma, puede explorarse o valorarse de alguna manera. Los marcadores genéticos para su uso en la práctica de la presente invención incluyen moléculas de polinucleótido que se pueden transcribir que codifican la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS, descrita en la Patente de EE. UU. 5.599.670), proteína fluorescente verde y variantes de la misma (GFP, descrita en las Patentes de EE. UU. 5.491.084 y 6.146.826), proteínas transmiten resistencia a antibióticos, o proteínas que transmiten tolerancia a herbicidas. Los marcadores de resistencia a antibióticos útiles, incluyendo los que codifican proteínas que transmiten resistencia a kanamicina (*nptII*), higromicina B (*aph IV*), estreptomycinina o espectinomycinina (*aad*, *spec/strep*) y gentamicina (*aac3* y *aacC4*), son bien conocidos en la técnica. Los herbicidas para los que la tolerancia de las plantas transgénicas se ha demostrado pueden incluir: herbicidas de ácido amino-metil-fosfónico, glifosato, glufosinato, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinilo, dalapon, dicamba, ciclohexanodiona, inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa, y isoxasflutol. Las moléculas de polinucleótido que se pueden transcribir que codifican proteína implicadas en la tolerancia a herbicidas se conocen en la técnica y pueden incluir una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que codifica la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS para la tolerancia al glifosato, descrita en las Patentes de EE. UU. 5.627.061; 5.633.435; 6.040.497; y 5.094.945); una molécula de nucleótido que se puede transcribir que codifica una glifosato oxidoreductasa y una glifosato-N-acetil transferasa (GOX, descrita en la Patente de EE. UU. 5.463.175; GAT, descrita en la Publicación de Patente de EE. UU. 20030083480; y dicamba monooxigenasa, descrita en la Publicación de Patente de EE. UU. 20030135879); una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que codifica la bromoxinil nitrilasa (*Bxn* para la tolerancia al bromoxinilo, descrita en la Patente de EE. UU. 4.810.648); una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que codifica la fitoeno desaturasa (*crtI*) descrita en Misawa, y col. (Plant Journal 4:833-840, 1993; y Plant Journal 6:481-489, 1994) para la tolerancia a norflurazona; una molécula de polinucleótido que se puede transcribir que codifica la acetohidroxiácido sintasa (AHAS, *aka* ALS) descrita en Sathasiivan, y col. (Nucl. Acids Res. 18:2188-2193, 1990) para la tolerancia a herbicidas de sulfonilurea; y el gen *bar* descrito en DeBlock, y col. (EMBO Journal 6:2513-2519, 1987) para la tolerancia al glufosinato y bialafos. Las moléculas promotoras comprendidas en las moléculas de ADN de la presente invención pueden expresar moléculas de polinucleótido que se pueden transcribir unidas que codifican la fosfinotricina acetiltransferasa, EPSPS resistente al glifosato, aminoglicósido fosfotransferasa, hidroxifenil piruvato deshidrogenasa, higromicina fosfotransferasa, neomicin fosfotransferasa, dalapon deshalogenasa, nitrilasa resistente al bromoxinilo, antranilato sintasa, ariloxialcanoato dioxigenasas, acetil CoA carboxilasa, glifosato oxidoreductasa, y glifosato-N-acetil transferasa.

También se incluyen dentro de la expresión "marcadores genéticos" los genes que codifican un marcador genético cuya secreción se puede detectar como medio de identificación o selección de las células transformadas. Los ejemplos incluyen marcadores que codifican un antígeno que se puede secretar que se puede identificar por la interacción con un anticuerpo, o incluso enzimas que se pueden secretar que se pueden detectar catalíticamente. Las proteínas indicadoras secretadas se encuentran en varias clases, incluyendo, proteínas pequeñas, de difusión que son detectables (por ejemplo, mediante un ELISA), enzimas activas pequeñas que se pueden detectar en la solución extracelular (por ejemplo, alfa-amilasa, beta-lactamasa, fosfinotricin transferasa), o proteínas que se insertan o atrapan en la pared celular (tal como proteínas que incluyen una secuencia líder tal como las que se encuentran en la unidad de expresión de extensión o proteínas relacionadas con la patogénesis del tabaco, también conocidas como PR-S del tabaco). Otros marcadores genéticos posibles serán evidentes para los expertos en la técnica.

#### 40 Transformación celular

El término "transformación" se refiere a la introducción de un ácido nucleico en un huésped receptor. Como se utiliza en el presente documento, el término "huésped" se refiere a una bacteria, un hongo o una planta, incluyendo cualquiera de las células, tejidos, órganos, o progenie de la bacteria, hongo o planta. Por ejemplo, una célula huésped puede ser cualquier célula de un organismo, tal como una célula vegetal, célula de algas, célula fúngica, hongo, célula bacteriana, o célula de insecto. Las células huésped y transformadas pueden incluir células de: plantas, *Aspergillus*, levaduras, insectos, bacterias y algas. Los tejidos y células vegetales de interés particular incluyen los protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, plántulas, embriones y polen.

Como se utiliza en el presente documento, el término "transformado" se refiere a una célula, tejido, órgano, u organismo en el que se ha introducido una molécula de polinucleótido ajena tal como una construcción. La molécula de polinucleótido introducida puede integrarse en el ADN genómico de la célula, tejido, órgano u organismo receptor de manera que la molécula de polinucleótido introducida es heredada por la progenie siguiente. Una célula u organismo "transgénico" o "transformado" también incluye la progenie de la célula u organismo y la progenie producida por un programa de cruzamiento que emplee dicho organismo transgénico como parental en una cruzamiento y presente un fenotipo alterado que sea el resultado de la presencia de una molécula de polinucleótido ajena. El término "transgénico" se refiere a una bacteria, hongo o planta que contienen una o más moléculas de ácido polinucleico heterólogo.

Hay muchos procedimientos para la introducción de moléculas de ácido polinucleico en las células vegetales. El procedimiento puede comprender en general las etapas de selección de una célula huésped adecuada, la transformación de la célula huésped con un vector recombinante, y la obtención de una célula huésped transformada. Los procedimientos adecuados incluyen infección bacteriana (por ejemplo, con *Agrobacterium*), vectores de cromosomas artificiales bacterianos binarios, el suministro 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 revestidas de ADN, (revisado en Potrykus, y col., Ann. Rev. Plant Physiol.

Plant Mol. Biol. 42: 205, 1991).

La tecnología para la introducción de una molécula de ADN en las células es bien conocida por los expertos en la técnica. Los procedimientos y materiales para la transformación de células vegetales mediante la introducción de una construcción de ADN vegetal en el genoma de una planta pueden incluir cualquiera de los procedimientos bien conocidos y demostrados. Se puede utilizar cualquiera de los procedimientos de transformación para transformar una célula huésped con una o más moléculas de ADN de la presente invención.

Las plantas transgénicas regeneradas se pueden auto polinizar para proporcionar plantas transgénicas homocigotas. De manera alternativa, el polen obtenido de las plantas transgénicas regeneradas se puede cruzar con plantas no transgénicas, preferentemente, líneas endogámicas de especies agronómicas importantes. Las descripciones de los procedimientos de cruzamiento que se utilizan comúnmente para los diferentes rasgos y cultivos se pueden encontrar en uno de los 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; Snee y Hendriksen, Plant breeding perspectives, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation, 1979; Fehr, Soybeans: Improvement, Production and Uses, 2ª Edición, Monograph, 16:249, 1987; Fehr, Principles of variety development, Theory and Technique, (Vol. 1) y Crop Species Soybean (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376, 1987. Por el contrario, el polen de las plantas no transgénicas se puede utilizar para polinizar las plantas transgénicas regeneradas.

Las plantas transformadas se pueden analizar en cuanto a la presencia de los genes de interés y el nivel de expresión y/o perfil transmitido por los elementos reguladores desvelados en el presente documento. Los expertos en la técnica son conscientes de los numerosos procedimientos disponibles para el análisis de plantas transformadas. Por ejemplo, los procedimientos para el análisis de plantas incluyen las transferencias de Southern y transferencias de Northern, estrategias basadas en PCR, análisis bioquímicos, procedimientos de exploración fenotípica, evaluaciones de campo, y análisis inmunodiagnósticos. La expresión de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir se puede medir utilizando los reactivos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los procedimientos que describe el fabricante y los tiempos de ciclo de PCR determinados utilizando la Matriz de ensayo TaqMan®. De manera alternativa, se pueden utilizar los reactivos de Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) y los procedimientos descritos por el fabricante para evaluar la expresión transgénica.

Las semillas de plantas de la presente invención se pueden recolectar de las plantas transgénicas fértiles y utilizarse para cultivar las generaciones de la progenie de plantas transformadas de la presente invención, incluyendo líneas de plantas híbridas que comprenden la construcción de la presente invención y que expresan un gen de interés agronómico.

La presente invención también partes de las plantas de la presente invención. Las partes de la planta incluyen las hojas, tallos, raíces, tubérculos, semillas, endospermo y polen. La invención también incluye y proporciona células vegetales transformadas que comprenden una molécula de ADN de la presente invención.

La planta transgénica puede pasar la molécula de polinucleótido transgénico a su progenie. La progenie incluye cualquier parte de la planta regenerable o semilla que comprende el transgén derivado de una planta ancestral. La planta transgénica es preferentemente homocigota para la molécula de polinucleótido transformada y transmite esa secuencia a toda la descendencia como resultado de una reproducción sexual. La progenie se puede cultivar a partir de semillas producidas por la planta transgénica. Estas plantas adicionales se pueden entonces auto polinizar para generar una verdadera línea de cruzamiento de plantas. La progenie de estas plantas se evalúa, entre otras cosas, en cuanto a su expresión genética. La expresión genética se puede detectar mediante varios procedimientos comunes tales como transferencia de Western, transferencia de Northern, inmunoprecipitación y ELISA.

Habiendo descrito ya en general la invención, la misma será más fácilmente entendida a través de la referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración. Se debería apreciar por los expertos en la técnica, que las técnicas desveladas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención. Los ejemplos que no se encuentran en el ámbito de las reivindicaciones son con fines ilustrativos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Elementos reguladores aislados de *Zea mays* y Grupos de elementos transcripcionales reguladores de la expresión

Los elementos reguladores se aislaron de *Zea mays*, y se construyeron las secuencias del grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión (EXP) que comprende los elementos reguladores de *Zea mays*.

La plantación temprana de semillas de maíz tal como a principios de abril en el norte de los EE. UU., pone las semillas de maíz en riesgos potencialmente perjudiciales. Por ejemplo, las condiciones de frío prolongado y humedad del campo pueden evitar la germinación óptima y el establecimiento de las plántulas. Por medio del perfil de transcripción

y la caracterización posterior se identificaron varios genes candidatos que presentaban un patrón de expresión útil para el desarrollo de las semillas y la germinación. El promotor y el líder de un gen candidato al que se hace referencia en el presente documento como P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO: 2) y L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO: 4), respectivamente, se amplificaron a partir del ADN genómico de maíz, y se clonó y se secuenció.

5 Los cebadores de amplificación se diseñaron basándose en las bibliotecas de las secuencias genómicas y EST públicas y privadas, que se utilizaron con el GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) que se construyeron siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 5' de la secuencia de ADN genómico correspondiente. Utilizando esta secuencia, se identificaron bioinformáticamente los elementos reguladores dentro de la región 5' del gen. Utilizando los resultados de este análisis se definieron los elementos reguladores dentro de la secuencia 5' corriente arriba de la secuencia codificante del gen. Los cebadores se diseñaron entonces para amplificar los elementos reguladores. La molécula de ADN correspondiente de cada elemento regulador se amplificó utilizando las condiciones de PCR convencionales con cebadores que contenían sitios de enzimas de restricción únicas y el ADN genómico aislado de *Zea mays*. Esta secuencia clonada comprendía el promotor y la secuencia 5' UTR corriente arriba de la región codificante de la proteína para el gen de *Zea mays*. El fragmento de ADN resultante se ligó en vectores de expresión en plantas básicas utilizando procedimientos de clonación de ADN convencionales y se secuenciaron.

Las secuencias de los grupos de elementos transcripcionales reguladores de la expresión (EXP) se proporcionan en el presente documento como SEQ ID NO: 1, 6 y 8, como se enumera en la Tabla 1 posterior. Una secuencia de promotor se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 2. Una secuencia líder se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 4. Las secuencias de intrón se proporcionan en el presente documento como SEQ ID NO: 5, 7, y 9.

**Tabla 1. Grupos de elementos transcripcionales reguladores de la expresión ("EXP"), promotores, líderes, e intrones aislados de distintas especies pratenses.**

Denominación	SEQ ID NO:	Descripción y/o elementos reguladores de EXP unidos en dirección 5' a 3'
EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1	1	EXP: P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO: 2); L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO: 4); I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 5)
P-Zm.Nac-1:1:2	2	Promotor
P-Zm.Nac-1:1:2+L-Zm.Nac-1:1:1	3	Promotor + Líder
L-Zm.Nac-1:1:1	4	Líder
I-Zm.DnaK-1:1:1	5	Intrón
EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1	6	EXP: P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO: 2); L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO: 4); I-Os.FBA-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 7)
I-Os.FBA-1-1:1:1	7	Intrón
EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1	8	EXP: P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO: 2); L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO: 4); I-Os.Cab-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 9)
I-Os.Cab-1-1:1:1	9	Intrón

25 Como se muestra en la Tabla 1 por ejemplo, el grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión (EXP) diseñado EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 1), con componentes aislados de *Zea mays*, comprende un elemento promotor, P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO: 2), que está unido operativamente en 5' al elemento líder, L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO: 4), que está unido operativamente en 5' al elemento intrón, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 5). Otros EXP se unen de manera similar, como se encuadra en la Tabla 1.

**Ejemplo 2**

30 **Análisis del EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 1) que dirige la GUS en el maíz transgénico**

Las plantas de maíz se transformaron con el vector de expresión en las plantas pMON73501, que contenía el grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión, EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 1) que dirige la expresión del transgén de la β-glucuronidasa (GUS) y se analizaron las plantas resultantes en cuanto a la expresión proteica de GUS.

35 La secuencia del EXP se clonó en una construcción plasmídica de transformación binaria para plantas utilizando procedimientos conocidos en la técnica. La construcción plasmídica de expresión en plantas resultante, pMON73501,

5 contenía una región limítrofe derecha de *A. tumefaciens*, y primer casete transgénico para ensayar el grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 1) unido operativamente a una secuencia codificante para la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS, SEQ ID NO: 14), unido operativamente en 5' a la región 3' UTR T-AGRtu.nos-1:1:13 (SEQ ID NO: 10); se utilizó un segundo casete transgénico de selección para la selección de las células vegetales transformadas que transmiten resistencia al herbicida glifosato dirigido por el promotor 35S del CaMV, EXP-CaMV.35S:1:1 (SEQ ID NO: 15), y una región limítrofe izquierda de *A. tumefaciens*. El plásmido resultante se utilizó para transformar las plantas de maíz.

10 Las plantas de maíz se transformaron con el vector de expresión de GUS, pMON73501. Los transformantes de la generación R<sub>0</sub>, seleccionados por inserciones de una única copia se cruzaron con plantas LH244 no transformadas para producir una población F1 de transformantes. Se midieron los niveles de expresión de GUS y los tejidos seleccionados en el curso del desarrollo. Los tejidos de F1 que se utilizaron para el estudio incluían: semillas embebidas, embriones, endospermo de semillas embebidas y coleóptilo de 3 días después de la germinación (DAG); hojas y raíces en estadio V3; raíces y hojas maduras en el estadio V7; raíces, hojas maduras y senescentes, mazorcas, barbas, internodos, anteras, y polen en el estadio VT (en la formación de mazorca, antes de la reproducción); granos 15 7 días antes de la polinización (DAP) y; embriones y endospermo 21 y 35 DAP. Las muestras de tejido seleccionadas también se analizaron en las plantas de F1 expuestas a condiciones de sequía y estrés por frío. Se tomaron muestras de los tejidos de raíces V3 y hojas después de la exposición al frío y sequía, así como dos días después de la recuperación de la exposición al frío (2 DAR).

20 Se indujo estrés a la sequía en F1, plantas V3 retirando el riego durante 4 días permitiendo que el contenido de agua se redujera al menos un 50 % del contenido de agua original de la planta regada completamente. El protocolo de sequía estaba comprendido esencialmente por las siguientes etapas. Las plantas en estadio V3 se privaron de agua. Cuando una planta de maíz experimenta una sequía, la forma de las hojas cambiará desde la apariencia habitual sana y sin dobleces a una hoja que presenta un plegamiento por la vena central y una apariencia en forma de V cuando se mira la hoja desde la punta al tallo. Este cambio de morfología comienza a producirse habitualmente aproximadamente a los 2 días después del cese del riego y se demostró en experimentos anteriores que se asociaba con la pérdida de agua de alrededor del 50 % según se mide por el peso de los tiestos antes del cese del riego y el peso de los tiestos cuando se observaba en la morfología de rizo de la hoja en plantas sin riego. Se consideraba que las plantas estaban en condiciones de sequía cuando las hojas presentaban marchitamiento como se evidenciaba por un rizado hacia dentro (forma en V) de la hoja. Este nivel de estrés se considera una forma de estrés subletal. Una vez que cada planta demostraba inducción a la sequía como se ha definido anteriormente, se destruyó la planta para adquirir muestras tanto de raíces como de hojas. Se utilizaron cuatro plantas de cada vector y se tomaron las mediciones de GUS como se ha descrito anteriormente.

35 Además de la sequía, las plántulas de F1 en germinación y plantas F1 en estadio V3 transformadas con pMON73501 también se expusieron a condiciones de frío para determinar si los elementos reguladores presentaban una expresión de GUS inducida por el frío. Sesenta semillas derivadas de seis semillas de cada uno de los 10 eventos de transformación se ensayaron en cuanto a la inducción de expresión genética en condiciones de frío. Las semillas germinaron en placas de Petri en papel de filtro saturado de agua. Tres días después de la germinación, las plántulas se expusieron a estrés por frío colocando las placas de Petri que contenían las plántulas germinadas en una cámara de cultivo oscura fijada a 10 °C durante 24 horas. La final del periodo de 24 horas, se tomaron muestras de la raíz y los tejidos del coleóptilo para la expresión cuantitativa de GUS como se describe posteriormente. Las plantas completas se ensayaron en cuanto a la inducción de la expresión de GUS con estrés por frío en el estadio V3. Veinte plantas de maíz en estadio V3, que comprendían 2 plantas de cada uno de los 10 eventos de transformación, se expusieron a una temperatura de 12 °C en una cámara de cultivo durante 24 horas. Las plantas de la cámara de cultivo se cultivaron bajo iluminación con luz blanca de 800 mmol/m<sup>2</sup>-s con un ciclo de luz de diez horas de luz blanca y catorce horas de oscuridad. Después de la exposición al frío, se tomaron muestras de los tejidos de las hojas y las raíces para la expresión cuantitativa de GUS.

50 Se utilizó el análisis histoquímico de GUS para el análisis de la expresión cuantitativa de las plantas transformadas. Se incubaron secciones de tejido completo con solución de tinción de GUS X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indoil-b-glucuronido) (1 mg/ml) durante una longitud de tiempo apropiada, se aclararon, y se inspeccionaron visualmente para la coloración azul. La actividad de GUS se determinó cualitativamente mediante inspección visual directa o inspección bajo un microscopio utilizando órganos y tejidos de planta seleccionados.

55 Para el análisis cuantitativo, se extrajo el total de proteínas de los tejidos seleccionados de plantas de maíz transformadas. Un microgramo de proteína total se utilizó con el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucuronido (MUG) en un volumen total de reacción de 50  $\mu$ l. Se midió la fluorescencia con una excitación a 365 nm, emisión a 445 nm, utilizando un Lector Micromax con Fluoromax-3 (Horiba; Kyoto, Japón), con una hendidura fijada en una excitación de 2 nm y emisión de 3 nm.

La Tabla 2 posterior muestra el nivel medio de la expresión de GUS en tejidos seleccionados de plantas F1 transformadas con pMON73501.

**Tabla 2. Valores medios de expresión de GUS de tejidos y tratamientos seleccionados de la generación F1 de plantas de maíz transformadas con pMON73501.**

Estadios	Órgano	Inductor	Media	SE
Semilla empapada	Embrión		1730,43	260,50
Semilla empapada	Endospermo		535,57	109,12
3 DAG	Raíz		290,78	65,98
3 DAG	Raíz	Frío	250,15	46,41
V3	Raíz		295,14	74,69
V3	Raíz	Frío	472,15	115,41
V3	Raíz	Frío 2 DAR	104,04	25,67
V3	Raíz	Sequía	384,97	66,98
V7	Raíz		125,12	24,65
VT	Raíz		57,80	13,56
3 DAG	Coleóptilo		205,49	34,89
3 DAG	Coleóptilo	Frío	249,79	37,83
V3	Hoja		66,34	18,55
V3	Hoja	Frío	290,51	89,09
V3	Hoja	Frío 2 DAR	417,18	85,36
V3	Hoja	Sequía	120,23	35,30
V7	Hoja - Madura		45,60	10,66
VT	Hoja - Madura		57,30	14,15
VT	Hoja - Senescente		195,07	59,39
VT	Mazorca		275,58	53,56
VT	Barbas		39,95	11,46
VT	Internodo		155,98	51,01
VT	Antera		474,59	100,53
VT	Polen		35,06	24,11
21 DAP	Embrión		622,61	65,11
35 DAP	Embrión		1140,81	135,70
7 DAP	Grano		350,35	20,28
21 DAP	Endospermo		684,27	64,73
35 DAP	Endospermo		738,38	96,71

5 Como se ve en la Tabla 2, una característica sorprendente con respecto a la expresión dirigida por la secuencia EXP, EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 1), que comprende el promotor y líder P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO: 2) y L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO: 4) era el nivel de expresión más alto observado en los embriones de semillas embebidas y tejidos del endospermo con respecto a las muestras de otros tejidos. Este alto nivel de expresión puede transmitir ventajas a la germinación de las semillas que expresan transgenes útiles para proporcionar una protección contra las condiciones de estrés por frío y humedad. La expresión también era más alta con respecto a los otros tejidos en el embrión y endospermo durante el desarrollo temprano de las semillas (21 y 35 DAP). Dicho patrón de expresión también puede ser ventajoso para facilitar la germinación y crecimiento de la semilla resultante. Por ejemplo, las proteínas o productos derivados de la expresión de los transgenes unidos operativamente al promotor Nac de *Zea mays* y el líder expresado durante los estadios tempranos del desarrollo de las semillas permitiría que se almacene la acumulación de proteínas o productos derivados en el desarrollo de las semillas para su uso rápido al germinar en condiciones de frío o humedad. La expresión en la germinación proporcionaría ventajas adicionales a la semilla

dirigiendo los transgenes deseados permitiendo la expresión de proteína o el producto derivado adicional en el momento crítico en condiciones de estrés por frío e hídrico. Una ligera inducción por frío también se observó en las hojas y raíces Ve en este experimento.

**Ejemplo 3**

**5 Análisis de elementos reguladores que dirigen la GUS en la R0 de maíz transgénico.**

Se transformaron las plantas con los vectores de expresión en plantas que contenían las secuencias EXP que dirigen la expresión del transgén de β-glucuronidasa (GUS), y las plantas resultantes se analizaron en cuanto a la expresión proteica de GUS. Los grupos de elementos transcripcionales reguladores de la expresión se clonaron en una construcción plasmídica de transformación binaria para plantas utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

10 Las construcciones plasmídicas de expresión en plantas resultantes contenían una región limítrofe derecha de *A. tumefaciens*, un primer casete transgénico para ensayar la secuencia EXP y una combinación de 3' UTR comprendida por una secuencia EXP (indicada en la Tabla 3), unida operativamente a una secuencia codificante para la β-glucuronidasa (GUS, SEQ ID NO: 14), unida operativamente en 5' a una región de terminación 3' (indicada en la Tabla 3); un segundo casete transgénico de selección que se utiliza para la selección de las células vegetales transformadas que transmiten resistencia al herbicida glifosato (CP4, US RE39247, dirigido por el promotor 1 de actina de arroz, EXP-Os.Act1:1:1, SEQ ID NO: 16), y una región limítrofe izquierda de *A. tumefaciens*. Los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar las plantas de maíz. La Tabla 3 enumera las denominaciones de los plásmidos, los grupos de elementos transcripcionales reguladores de la expresión, que también se describen en la Tabla 1, y las 3' UTR que se sitúan en unión operativa con la secuencia codificante de GUS. Cada construcción plasmídica estaba comprendida por una configuración de casete de un único transgén comprendido por intrones y 3' UTR específicos situados en unión operativa con el promotor y el líder P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO: 2) y L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO: 4).

**Tabla 3. Construcciones plasmídicas de GUS y grupos de elementos transcripcionales reguladores de la expresión y 3' UTR correspondientes.**

Construcción de plásmido	Grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión	SEQ ID NO:	3' UTR	SEQ ID NO:
pMON122713	EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1	6	T-Os.Mth-1:1:1	12
pMON122715	EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1	6	T-Os.CLUS33428_1-1:1:1	11
pMON127422	EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1	8	T-Os.Ara5-1:1:1	13
pMON128892	EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1	8	T-Os.Mth-1:1:1	12

25 Las plantas se transformaron utilizando procedimientos de transformación mediados por *Agrobacterium* conocidos en la técnica. El análisis histoquímico y cuantitativo de GUS se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 2 anterior. La media de expresión de GUS en R<sub>0</sub> observada para cada casete de transgén de GUS transformado en plantas de maíz se presenta en la Tabla 4 posterior.

**Tabla 4. Media de expresión de GUS en R<sub>0</sub> en tejidos radical y foliar.**

Estadio	Órgano	Media de expresión de GUS			
		pMON122713	pMON122715	pMON127422	pMON128892
V3	Hoja	nd	128,28	65,73	nd
	Raíz	nd	73,61	nd	nd
V4	Hoja	7,47	Nd	nd	261,38
	Raíz	3,15	Nd	nd	nd
V7	Hoja	nd	110,47	34,18	68,43
	Raíz	nd	11,17	5,57	nd

30

(continuación)

Estadio	Órgano	Media de expresión de GUS			
		pMON122713	pMON122715	pMON127422	pMON128892
VT	Hoja	5,81	42,23	87,04	102,55
	Raíz	2,02	26,34	1,16	20,76
	Anteras	20,45	115,86	22,47	145,84
VT/R1	Barbas	46,33	18,63	97,14	nd
R3	21DAP-Embrión	229,75	165,29	385,4	220,5
	21DAP-Endospermo	40,47	215,04	192,02	223,77

En consonancia con los resultados obtenidos en el Ejemplo 2, la Tabla 4 muestra que la expresión era más alta en el embrión en desarrollo (21 DAP) para los cuatros casetes transgénicos. La FIG. 1 ilustra los diferentes patrones de expresión que se transmitían por cada configuración de casete transgénico. Por ejemplo, la expresión en las hojas era más alta en los casetes transgénicos comprendidos por la secuencia EXP, EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1 (SEQ ID NO: 8), que está unido operativamente a la 3' UTR, T-Os.Ara5-1:1:1 (SEQ ID NO: 13) con respecto a los otros tres casetes transgénicos. Se observaron niveles similares de expresión en el embrión en desarrollo y endospermo de las plantas transformadas con el casete de expresión comprendido por el grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión, EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1 (SEQ ID NO: 8), que está unido operativamente a la 3' UTR, T-Os.Mth-1:1:1 (SEQ ID NO: 12). Para el casete transgénico comprendido por el grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión, EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1 (SEQ ID NO: 6), que está unido operativamente a la 3' UTR, T-Os.Mth-1:1:1 (SEQ ID NO: 12), la expresión en el endospermo era mucho menor con respecto a la expresión en el embrión. Para el casete transgénico comprendido por el grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión, EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1 (SEQ ID NO: 6), que está unido operativamente a la 3' UTR, T-Os.CLUS33428\_1-1:1:1 (SEQ ID NO: 11), la expresión en el embrión era mucho menor con respecto a la expresión en el endospermo. Cada configuración de casete transgénico proporcionaba un patrón de expresión único en la semilla de R<sub>0</sub> en desarrollo.

También se observaron diferencias de expresión en la raíz, hojas, anteras, y barbas, así como en la semilla en desarrollo de plantas transformadas con los cuatro casetes transgénicos diferentes. La FIG. 2 ilustra los diferentes patrones de expresión que se transmitían por cada configuración de casete transgénico en cada uno de los tejidos descritos anteriormente. Por ejemplo, la expresión en las hojas era más alta en los casetes transgénicos comprendidos por la secuencia EXP, EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1 (SEQ ID NO: 8) con respecto a los casetes transgénicos que comprenden EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1 (SEQ ID NO: 6). Otra expresión era más alta en los dos casetes transgénicos comprendidos por el grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión, EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1 (SEQ ID NO: 6), que está unido operativamente a la 3' UTR, T-Os.CLUS33428\_1-1:1:1 (SEQ ID NO: 11) y el grupo de elementos transcripcionales reguladores de la expresión, EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1 (SEQ ID NO: 8), que está unido operativamente a la 3' UTR, T-Os.Mth-1:1:1 (SEQ ID NO: 12). Cada una de las cuatro configuraciones de casetes transgénicos proporcionaban patrones de expresión únicos en los transformantes de R<sub>0</sub>.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Monsanto Technology LLC  
Ahrens, Jeffrey E.  
Cherian, Shoba  
Loida, Paul J.  
Lutfiyya, Linda L.  
Wu, Wei  
Xie, Jiali

&lt;120&gt; ELEMENTOS REGULADORES EN PLANTAS Y USOS DE LOS MISMOS

&lt;130&gt; MONS:326WO

<140> Desconocido  
<141> 10-04-2013

<150> 61/635.945  
<151> 20-04-2012

<150> 13/830.403  
<151> 14-03-2013

ES 2 743 917 T3

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2305

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Grupo quimérico de elementos transcripcionales reguladores de la expresión

<400> 1

<b>gaggtgcata</b>	<b>aggctggcaa</b>	<b>gacgacagtt</b>	<b>aggaacgcat</b>	<b>gcgagcgagg</b>	<b>ttgacggacg</b>	<b>60</b>
<b>cgataaggtt</b>	<b>agcgcgatgcg</b>	<b>tcgaacgcgg</b>	<b>gctggcgagg</b>	<b>gtggaaggca</b>	<b>tgataaggct</b>	<b>120</b>
<b>attgggtagc</b>	<b>gcaaaatgtg</b>	<b>tagacagcgg</b>	<b>gcgagtgagg</b>	<b>atggcagtgg</b>	<b>tgccatgcat</b>	<b>180</b>
<b>ggacgcggtt</b>	<b>ggagcatacg</b>	<b>cgacaagaat</b>	<b>ggagcacgac</b>	<b>gtagatttcg</b>	<b>ggaggccgtg</b>	<b>240</b>
<b>gttggagcgc</b>	<b>ccgcgggcca</b>	<b>gatggcggcc</b>	<b>atggttagag</b>	<b>cgcccgtggt</b>	<b>tacgggtggg</b>	<b>300</b>
<b>ttcatggcga</b>	<b>gcgagggggt</b>	<b>tgcaagattt</b>	<b>ccagggcgct</b>	<b>cgggtcggtt</b>	<b>gcaagctcca</b>	<b>360</b>
<b>cggtggaggc</b>	<b>gtgacggaga</b>	<b>cgacgtgggg</b>	<b>agggaggtcg</b>	<b>tggggaaatt</b>	<b>cggaocgagca</b>	<b>420</b>
<b>gaggcgtggc</b>	<b>aggtgtggca</b>	<b>tggggagggg</b>	<b>ggtcgcgggg</b>	<b>agggcgcagg</b>	<b>gaggtggcat</b>	<b>480</b>
<b>ggggagggag</b>	<b>gctggggacg</b>	<b>aagatgatgt</b>	<b>gggccagag</b>	<b>ggacgcggga</b>	<b>caaagaattg</b>	<b>540</b>
<b>cgtatgataa</b>	<b>cgggttgatt</b>	<b>cgtagaattt</b>	<b>taggcggtat</b>	<b>ttataaaaat</b>	<b>gacgcaggac</b>	<b>600</b>
<b>agccattggt</b>	<b>actgatactt</b>	<b>taatatagta</b>	<b>gagaagagat</b>	<b>ataaattagg</b>	<b>acgggtacaa</b>	<b>660</b>
<b>caagaccaca</b>	<b>cgtactaaca</b>	<b>tttttttttg</b>	<b>tcacaggctg</b>	<b>ctctaataca</b>	<b>tatctctatg</b>	<b>720</b>
<b>ataagcgagc</b>	<b>tagggatgct</b>	<b>agcgtgtcca</b>	<b>tttgattcct</b>	<b>atataaatct</b>	<b>ccaattatag</b>	<b>780</b>
<b>ctgtagcaat</b>	<b>taatttaata</b>	<b>aacacccaac</b>	<b>aatagatcaa</b>	<b>atctcatagc</b>	<b>aatcataat</b>	<b>840</b>

10

ES 2 743 917 T3

catgaatgct ccaaaatcag ctagctggct ctccottatc ttcgtttttc cttctttctcc 900  
 tgcaacgaaa agaaaaaaaa agaaaagaaa agaaaacggc cgcttgtggt actaactccc 960  
 aactacgcac ctaccgcgcg cataactcct ggccgcctgc cctcatcacc tccgcgtcgc 1020  
 cgtcgactca tccttatcct ccccatcacg ctccccccgc gcccgccacc cgccatccgt 1080  
 actttcccgg ccgccccacc gctggccgcc ccgacgtgtc gcgccgccac cggaaggtec 1140  
 cgggccgtcg ggcgggcaga gcgcctgcag cgggtgaccc accccacgct gacgcggggc 1200  
 cgcgtccgtc caagaaacct gacgtaagca gtgacagaat tggcgccgcc tctcggcgtc 1260  
 cacgtgtcgt ggtcaacctg tcagagtggg gctccgtgtg tgcgctaccg caggggcccg 1320  
 ggcacggggc cacacgtgtc gcggtogacc gcggctataa atgcccggtc ccgcactcgg 1380  
 aacaagtttc aagctctcct cccctcttcc taccattagc agtagccaca gccagaacac 1440  
 cagcagacag cagcatcagc agggaggaac acctcgaggc ctccgactag tcgagagatc 1500  
 taccgtcttc ggtacgcgct cactccgccc tctgcctttg ttactgccac gtttctctga 1560  
 atgctctctt gtgtggtgat tgctgagagt ggtttagctg gatctagaat tacactctga 1620  
 aatcgtgttc tgctgtgct gattaactgc cgtcctttgt agcagcaaaa tatagggaca 1680  
 tggtagtacg aaacgaagat agaacctaca cagcaatacg agaaatgtgt aatttgggtgc 1740  
 ttagcggtat ttatttaagc acatgttggg gttatagggc acttggattc agaagtttgc 1800  
 tgtaattta ggcacaggct tcatactaca tgggtcaata gtatagggat tcatattata 1860  
 ggcgatacta taataatttg ttcgtctgca gagcttatta tttgccaaaa ttagatattc 1920  
 ctattctgtt tttgtttgtg tgctgttaaa ttgttaacgc ctgaaggaat aaatataaat 1980  
 gacgaaatth tgatgtttat ctctgctcct ttattgtgac cataagtcaa gatcagatgc 2040  
 acttgtttta aatattgttg tctgaagaaa taagtaactga cagtattttg atgcattgat 2100  
 ctgcttgttt gttgtaacaa aatttaaaaa taagagttt cctttttgtt gctctcctta 2160  
 cctcctgatg gtatctagta tctaccaact gacactatat tgcttctctt tacatacgta 2220  
 tcttctcga tgccttctcc ctagtgttga ccagtgttac tcacatagtc tttgctcatt 2280  
 tcattgtaat gcagatacca agcggg 2305

<210> 2  
 <211> 1386  
 <212> ADN  
 <213> *Zea mays*  
 <400> 2

5

ES 2 743 917 T3

gaggtgcata aggctggcaa gacgacagtt aggaacgcat gcgagcgagg ttgacggacg 60  
 cgataagggt agcgcgatgcg tcgaacgcgg gctggcgagg gtggaaggca tgataaggct 120  
 attgggtagc gcaaaatgtg tagacagcgg gcgagtgagg atggcagtgg tggcatgcat 180  
 ggacgcgggt ggagcatacg cgacaagaat ggagcacgac gtagatttcg ggaggccgtg 240  
 gttggagcgc ccgcgggcga gatggcggcc atggttagag cgcccgtggt tacgggtggg 300  
 ttcatggcga gcggaggggt tgcaagattt ccagggcgct cgggtcgggt gcaagctcca 360  
 cgggtggaggc gtgacggaga cgacgtgggg agggaggtcg tggggaaatt cggacgagca 420  
 gaggcgtggc aggtgtggca tggggagggg ggtcgcgggg agggcgcagg gaggtggcat 480  
 ggggagggag gctggggacg aagatgatgt gggcccagag ggacgcggga caaagaattg 540  
 cgtatgataa cgggttgatt cgtagaattt taggcggtat ttataaaaat gacgcaggac 600  
 agccattggt actgatactt taatatagta gagaagagat ataaattagg acgggtacaa 660  
 caagaccaca cgtactaaca ttttttttg tcacaggctg ctctaataca tatctctatg 720  
 ataagcgagc tagggatgct agcgtgtcca tttgattcct atataaatct ccaattatag 780  
 ctgtagcaat taatttaata aacacccaac aatagatcaa atctcatagc aatcataat 840  
 catgaatgct ccaaaatcag ctagctggct ctcccttate ttcgttttc cttcttctcc 900  
 tgcaacgaaa agaaaaaaaa agaaaagaaa agaaaacggc cgcttgtggt actaaactcc 960  
 aactacgcac ctaccgcgog cataactctt ggccgcctgc cctcatcacc tccgogtgcg 1020  
 cgtcgactca tccttatcct ccccatcacg ctcaacccgc gcccgcacccg cgcocatcgt 1080  
 actttcccg cgcgcccaacc gctggcgcgc ccgacgtgtc gcgcgcgccac cgggaaggtcc 1140  
 cgggccgtcg ggcgggcaga gcgcctgcag cgggtggaccc acgccacgct gacgcggggcg 1200  
 cgcgtccgtc caagaaacct gacgtaagca gtgacagaat tggcgcgcgc tctcggcgtc 1260  
 cacgtgtcgt ggtcaacctg tcagagtggg gctccgtgtg tgcgctaccg cagggggcccg 1320  
 gcgcacgggc cacacgtgtc gcggtcgacc gcggctataa atgcccggt cgcactcgg 1380  
 aacaag 1386

<210> 3  
 <211> 1471  
 <212> ADN  
 <213> *Zea mays*  
 <400> 3

5

ES 2 743 917 T3

gaggtgcata aggctggcaa gaogacagtt aggaacgcat gcgagcgagg ttgacggacg 60  
 cgataagggt agcgcacgcg tcgaacgcgg gctggcgagg gtggaaggca tgataaggct 120  
 attgggtagc gcaaaatgtg tagacagcgg gcgagtgagg atggcagtgg tggcatgcat 180  
 ggacgcgggt ggagcatacg cgacaagaat ggagcacgac gtagatttcg ggaggccgtg 240  
 gttggagcgc ccgcgggcga gatggcggcc atggttagag cgcocgtggt taocgggtggg 300  
 ttcattggcg ggcgaggggt tgcaagattt ccagggcgct cgggtcgggt gcaagctcca 360  
 cgggtggaggc gtgacggaga cgacgtgggg agggaggtcg tgggaaatt cggacgagca 420  
 gaggcgtggc aggtgtggca tggggagggg ggtcgcgggg agggcgcagg gaggtggcat 480  
 ggggagggag gctggggacg aagatgatgt gggcccagag ggacgcggga caaagaattg 540  
 cgtatgataa cgggttgatt cgtagaattt taggcggtat ttataaaaat gaocgaggac 600  
 agccattggt actgatactt taatatagta gagaagagat ataaattagg acgggtacaa 660  
 caagaccaca cgtactaaca ttttttttg tcacaggctg ctctaataca tatctctatg 720  
 ataagcgagc tagggatgct agcgtgtcca tttgattcct atataaatct ccaattatag 780  
 ctgtagcaat taatttaata aacacccaac aatagatcaa atctcatagc aaatcataat 840  
 catgaatgct ccaaaatcag ctagctggct ctcccttacc ttctgttttc ottcttctcc 900  
 tgcaacgaaa agaaaaaaaa agaaaagaaa agaaaacggc cgcttgtggt actaactccc 960  
 aactacgcac ctaccgcgcg cataactctt ggccgcctgc cctcatcacc tccgcgtcgc 1020  
 cgtcgactca tccttatect ccccatcacg ctaccccgc gcccgaccg cgcctccgt 1080  
 actttcccgg ccgccccacc gctggcggcc ccgacgtgtc gcgcccacc cggaggggtcc 1140  
 cgggcccgtc ggcgggcaga gcgcctgcag cgggtgacc accgccagct gacgcgggcg 1200  
 cgcgtccgtc caagaaacct gacgtaagca gtgacagaat tggcgccgc tctcggogtc 1260  
 cacgtgtcgt ggtcaacctg tcagagtggg gctccgtgtg tgcgctaccg caggggcccg 1320  
 gcgcacgggc cacacgtgtc gcggtcgacc gcggctataa atgcccggct ccgcaactcg 1380  
 aacaagtttc aagctctcct ccctcttcc taccattagc agtagccaca gccagaacac 1440  
 cagcagacag cagcatcagc agggaggaac a 1471

<210> 4  
 <211> 85  
 <212> ADN  
 <213> *Zea mays*

5

<400> 4  
 tttaagctc tcctcccctc ttctacat tagcagtagc cacagccaga acaccagcag 60  
 acagcagcat cagcaggag gaaca 85

<210> 5  
 <211> 804

ES 2 743 917 T3

<212> ADN  
 <213> *Zea mays*

<400> 5

```

accgtcttcg gtacgcgctc actccgcoct ctgcctttgt tactgccacg tttctctgaa      60
tgctctcttg tgtggtgatt gotgagagtg gtttagctgg atctagaatt acaactctgaa      120
atcgtgttct gcctgtgctg attacttgcc gtccctttgta gcagcaaaat atagggacat      180
ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttggtgct      240
tagcggattt tatttaagca catgttgggtg ttatagggca cttggattca gaagtttgct      300
gttaatttag gcacaggctt catactacat gggccaatag tatagggatt catattatag      360
gcgatactat aataatttgt tcgtctgcag agcttattat ttgccaaaat tagatattcc      420
tattctgttt ttgtttgtgt gctgttaaat tgtaaacgcc tgaaggaata aatataaatg      480
acgaaatfff gatgtttatc totgctcctt tattgtgacc ataagtcaag atcagatgca      540
cttgttttaa atattgttgt ctgaagaaat aagtactgac agtattttga tgcattgatc      600
tgcttgtttg ttgtaacaaa atttaaaaat aaagagtttc ctttttgttg ctctccttac      660
ctctgatgg tatctagtat ctaccaactg acactatatt gcttctcttt acatacgtat      720
cttgctcgat gccttctccc tagtgttgac cagtgttact cacatagtct ttgctcattt      780
cattgtaatg cagataccaa goggg                                           804
  
```

5 <210> 6  
 <211> 2232  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Grupo quimérico de elementos transcripcionales reguladores de la expresión

<400> 6

ES 2 743 917 T3

gaggtgcata	aggctggcaa	gacgacagtt	aggaacgcat	gcgagcgagg	ttgacggacg	60
cgataagggt	agcgcatgcg	tcgaacgcgg	gctggcgagg	gtggaaggca	tgataaggct	120
attgggtagc	gcaaaatgtg	tagacagcgg	gcgagtgagg	atggcagtgg	tggcatgcat	180
ggacgcgggt	ggagcatacg	cgacaagaat	ggagcaogac	gtagatttcg	ggaggccgtg	240
gttggagcgc	ccgcgggcga	gatggcggcc	atggttagag	cgcccggtgt	tacgggtggg	300
ttcatggcga	gcggaggggt	tgcaagattt	ccagggcgct	cggttcgggt	gcaagctcca	360
cggtggaggc	gtgacggaga	cgacgtgggg	agggaggtcg	tggggaaatt	cggacgagca	420
gaggcgtggc	aggtgtggca	tggggagggg	ggtcgcgggg	agggcgcagg	gaggtggcat	480
gggaggggag	gctggggacg	aagatgatgt	gggccagag	ggacgcggga	caaagaattg	540
cgtatgataa	cggtttgatt	cgtagaattt	taggcggtat	ttataaaaat	gacgcaggac	600
agccattggt	actgatactt	taatatagta	gagaagagat	ataaattagg	acgggtacaa	660
caagaccaca	cgtactaaca	tttttttttg	tcacaggctg	ctctaataca	tatctctatg	720
ataagcgagc	tagggatgct	agcgtgtcca	tttgattcct	atataaatct	ccaattatag	780
ctgtagcaat	taatttaata	aacacccaac	aatagatcaa	atctcatagc	aatcataat	840
catgaatgct	ccaaaatcag	ctagctgggt	ctcccttata	ttcgtttttc	cttcttctcc	900
tgcaacgaaa	agaaaaaaaa	agaaaagaaa	agaaaacggc	cgcttgtggt	actaactccc	960
aactacgcac	ctaccgcgcg	cataactott	ggccgcctgc	cctcatcacc	tcgcgctcgc	1020

ES 2 743 917 T3

cgctogactca	tccttatcct	ccccatcaag	ctcaccocgc	gcccgcaccg	cgccatccgt	1080
actttccgg	ccgccccacc	gctggccgco	ccgacgtgtc	gcgccgccac	cggaagggtcc	1140
cgggccgctcg	ggcgggcaga	gcgocctgcag	cggtggacc	acgccacgct	gacgcgggcg	1200
cgcgctccgtc	caagaaacct	gacgtaagca	gtgacagaaat	tggcgccgccc	tctcggcgctc	1260
cacggtgctgt	ggtcaacctg	tcagagtggg	gctccgtgtg	tgcgctaccg	caggggcccg	1320
gcgcacgggc	cacacgtgtc	gcggtcgacc	gcggtataa	atgcccggt	ccgcaactcg	1380
aacaagtttc	aagctctcct	cccctcttc	taccattagc	agtagccaca	gccagaacac	1440
cagcagacag	cagcatcagc	agggaggaa	acctgcaggc	ctacgctgac	aagctgactc	1500
tagcagatcc	tctagaacca	tctccacac	actcaagcca	cactattgga	gaacacacag	1560
ggacaacaca	ccataagatc	tcaagaccgc	ggtatgcttt	ctgaatatca	tccgtactgt	1620
tctatggttt	ttggcatgca	tttgttctc	ctttatatca	atgacaagtg	aaggaacttt	1680
atgtagtttt	atgatagata	taagcacttt	atcgtcagga	aatcaaatag	gatgtgcagt	1740
caagctaagt	tatatatagc	agaattcagt	gaacataaaa	cacttgtttt	gatataacat	1800
gattcaata	tactggcatc	tctagttoaa	atctactctt	caaagttata	taatgcattt	1860
gaaggaaaat	ttctatcttc	aacttcacag	aaagcaaat	agatatgatt	tgtgtatacc	1920
aatgaactt	agagactcaa	aatatactag	taatacattt	gtaaactcga	catctgcatc	1980
aagacatgac	atgggttaac	cactagcagt	tgtaaggata	aagcatgaag	cattcatgtg	2040
tcctgcttat	gttctatgaa	ccatctgcag	gtcataattc	agaagaaaag	tttggaaactt	2100
ctaatoctac	aacataacaa	gcatactttt	atcaactttg	gataataaat	tcttaagatg	2160
agtttttcat	tcaattatgg	ttcagaacta	gaagattaaa	aactttatcc	ttcttgctgt	2220
agaaaaccat	tg					2232

<210> 7  
 <211> 651  
 <212> ADN  
 <213> *Oryza sativa*  
 <400> 7

5

ES 2 743 917 T3

caagaccgog gtatgctttc tgaatatcat cegtactgtt ctatggtttt tggcatgcat	60
ttgtttcctc tttatatcaa tgacaagtga aggaacttta tgtagtttta tgatagatat	120
aagcacttta tgcgcaggaa atcaaatagg atgtgcagtc aagctaagtt atatatagca	180
gaattcagtg aacataaaac acttggtttg atataacatg attcaaatat actggcatct	240
ctagttcaaa tctactcttc aaagttatat aatgcatttg aaggaaaatt tctatcttca	300
acttcacaga aagcaaaata gatatgattt gtgtatacca aatgaaactta gagactcaaa	360
atatactagt aatacatttg taaactcgac atctgcatca agacatgaca tgggttaacc	420
actagcagtt gtaaggataa agcatgaagc attcatgtgt cctgcttatg ttctatgaac	480
catctgcagg tcataattca gaagaaaagt ttggaacttc taatcctaca acataacaag	540
catactttta tcaactttgg ataataaatt ctttaagatga gtttttcatt caattatggt	600
tcagaactag aagattaaaa actttatcct tcttgctgta gaaaaccatt g	651

<210> 8

<211> 1629

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Grupo químérico de elementos transcripcionales reguladores de la expresión

<400> 8

ES 2 743 917 T3

gaggtgcata aggctggcaa gacgacagtt aggaacgcat gcgagcgagg ttgacggacg 60  
 cgataagggt agcgcatgcg togaacgcgg gctggcgagg gtggaaggca tgataaggct 120  
 attgggtagc gcaaaatgtg tagacagcgg gcgagtgagg atggcagtgg tggcatgcat 180  
 ggacgcgggt ggagcatacg cgacaagaat ggagcacgac gtagatttcg ggaggccgtg 240  
 gttggagcgc ccgogggcga gatggcgcc atggttagag cgcccgtggt tacgggtggg 300  
 ttcattggcg gcgaggggt tgcaagattt ccaggcgct cgggtcgggt gcaagctcca 360  
 cgggtggaggc gtgacggaga cgacgtgggg agggaggctg tggggaaatt cggacgagca 420  
 gaggcgtggc aggtgtggca tggggagggg ggtcgcgggg agggcgcagg gaggtggcat 480  
 ggggagggag gctggggacg aagatgatgt gggcccagag ggacgcggga caaagaattg 540  
 cgtatgataa cgggttgatt cgtagaattt taggcggtat ttataaaaat gacgcaggac 600  
 agccattggt actgatactt taatatagta gagaagagat ataaattagg acgggtacaa 660  
 caagaccaca cgtactaaca ttttttttg tcacaggctg ctctaataca tatctctatg 720  
 ataagcgagc tagggatgct agcgtgtcca tttgattcct atataaatct ccaattatag 780  
 ctgtagcaat taatttaata aacacccaac aatagatcaa atctcatagc aatcataat 840  
 catgaatgct ccaaaatcag ctagctggct ctcccttate ttcgttttc cttcttctcc 900  
 tgcaacgaaa agaaaaaaaa agaaaagaaa agaaaacggc cgcttgtggt actaaactccc 960  
 aactacgcac ctaccgcgcg cataactctt ggccgcctgc cctcatcacc tccgcgtcgc 1020  
 cgtcgactca tcttatacct ccccatcacg ctcaaccocg gcccgccacc cgcctatcgt 1080  
 actttcccgg ccgccccacc gctggccgcc ccgacgtgtc gcgcccacc cgggaaggctc 1140  
 cgggcccgtc ggcgggcaga ggcctgcag cgggtggacc acgccacgct gacgcggggc 1200  
 cgcgctccgtc caagaaacct gacgtaagca gtgacagaat tggcgccgcc tctcggcgtc 1260  
 caogtgtcgt ggtcaacctg tcagagtggg gtcocgtgtg tgcgctaccg cagggggccc 1320  
 ggcacggggc cacacgtgtc gcggtcgacc gcggtataa atgcccggt cgcactcgg 1380  
 aacaagttc aagctctcct cccctcttcc taccattagc agtagccaca gccagaacac 1440  
 cagcagacag cagcatcagc agggaggaac acctgcaggc ctacacgctg acaagctgac 1500  
 tctagcagat ctccctgcca aggtatatat gctgattgat ttctactctt cctcaattca 1560  
 aaattgaaag atattatgct gatctggtta aatttatggt tggtttggt tggtttcagc 1620  
 aaggtgctg 1629

<210> 9  
 <211> 117  
 <212> ADN  
 <213> *Oryza sativa*  
 <400> 9

5

ES 2 743 917 T3

	ccctgccaaag gtatatatgc tgattgattt ctactcttcc tcaattcaaa attgaaagat	60
	attatgctga tctggttaaa tttatgtttg gtttggtttg gtttcagcaa ggtgctg	117
	<210> 10	
	<211> 253	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
	<400> 10	
	gacggttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctggtgc cggctcttgcg	60
	atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc	120
	atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac	180
	gogatagaaa acaaaatata gogogcaaac taggataaat tatogogcgc ggtgtcatct	240
	atgttactag atc	253
	<210> 11	
	<211> 380	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Oryza sativa</i>	
	<400> 11	
	tcgatcaatc gatacogtgc tegtctoggc tegtcatcaa tgcgatcga tgggtogttt	60
	tcacctaata ataataaat catatgtgtg tgtgcaaaga ataacgaatt aacctcccca	120
	agcttcatgt atgcatacat gcategtag tgcattgtgc cctgatcatg ggtctctggg	180
	ggaggatcat gttgtgtcgt gtgtcggctg tgtctcggtt atcgtcttat cgatttcgat	240
	catatcggcc aattgttgc gcgctggcca cgtatatgta ottgatgat gaccgagaaa	300
	ctcctaggtc aatctgtgtg ttcatatata catcagttca ataaatgat cgtaattat	360
	attacaaagt tttgcattt	380
	<210> 12	
	<211> 300	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Oryza sativa</i>	
	<400> 12	
	ggccaaggcg atctatgact gaattgcaa tgcaccagcc tgtctacatg atgaataaat	60
	aaagagtcca tccagtgtga tggctcatgc ctgtgtgagt gtgactgaat ccatcagtgt	120
	gtgtgtgtgt ttgtgtcaac catgtgtgaa tcagggtgtca aaaatcgtgg ctggaaatcc	180
	atgtggtttc tagctttatg taaatgttgt ttgtgaaata taaatattgt tttgtgtatg	240
	tgaattttac tctctcattt ttctcttgca ctccaccattc tattatagta atttttttaa	300
	<210> 13	
	<211> 213	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Oryza sativa</i>	
	<400> 13	

ES 2 743 917 T3

ctaggctact gtagctagct gtgcatgtat gtggtgtggt tactaaaata attagtgttt 60  
 tccttttggt tggaagcata tgtgtggtga ataaatgatg aactccgatg ttctctctta 120  
 taaatcttga tgattogcta gctatccgta cgctgttgtt ctttgatttg atgatgagat 180  
 tgaaaaatgg aatgtcatgc taaggagggt gcc 213

<210> 14

<211> 1812

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante con el codón rediseñado

<400> 14

atggtccgtc ctgtagaaac cccaaccggt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60  
 ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttacaa 120  
 gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt ttaacgatc agttcgccga tgcagatatt 180  
 ogtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaaagtct ttataccgaa aggttgggca 240  
 ggccagcgta tcgtgctgcg tttcgatgcg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300  
 aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgcog 360  
 tatgttattg cgggaaaag tgtacgtatc acogtttgtg tgaacaacga actgaactgg 420  
 cagactatcc cgccgggaat ggtgattacc gacgaaaacg gcaagaaaaa gcagtcttac 480  
 ttocatgatt tctttaacta tgccggaatc catcgcagcg taatgctcta caccacgccc 540  
 aacacctggg tggacgatat caccgtgggt acgcatgtcg cgcaagactg taaccacgcg 600  
 tctgttgact ggcaggtggt ggccaatggt gatgtcagcg ttgaactgcg tgatgcggat 660  
 caacaggtgg ttgcaactgg acaaggcact agcgggactt tgcaagtggt gaatccgcac 720

ES 2 743 917 T3

ctctggcaac cgggtgaagg ttatctctat gaactgtgcy tcacagccaa aagccagaca 780  
gagtgtgata tctaccgct tcgctcggc atccggtcag tggcagtga gggcgaacag 840  
ttcctgatta accacaaacc gttctacttt actggctttg gtctcatga agatgctggac 900  
ttgctggca aaggattcga taactgtctg atggtgcaag accacgcatt aatggactgg 960  
attggggcca actcctaccg tacctcgcat tacccttaag ctgaagagat gctcactgg 1020  
gcagatgaac atggcatcgt ggtgattgat gaaactgctg ctgtcggctt taacctctct 1080  
ttaggcattg gtttcgaagc gggcaacaag ccgaaagaac tgtacagcga agaggcagtc 1140  
aacggggaaa ctacgaagc gcacttacag gcgattaaag agctgatagc gcgtgacaaa 1200  
aaccacccaa gcgtggtgat gtggagtatt gccaacgaac cggatacccg tccgcaaggt 1260  
gcaocgggaat atttcgctcc actggcggaa gcaacgcgta aactcgaccg gacgcgtccg 1320  
atcacctgcy tcaatgtaat gttctgcyac gctcacaccg ataccatcag ccatctcttt 1380  
gatgtgctgt gcctgaaccg ttattacgga tggatgtcc aaagcggcga tttggaaaocg 1440  
gcagagaagg tactggaaaa agaacttctg gcctggcagc agaaactgca tcagccgatt 1500  
atcatcaccg aatacggcgt ggatacgtta gccgggctgc actcaatgta caccgacatg 1560  
tggagtgaag agtatcagtg tgcattgctg gatatgtatc accgcgtctt tgatcgcgtc 1620  
agcgcctgcy tcggtgaaca ggtatggaat ttgcctgatt ttgcgacctc gcaaggcata 1680  
ttgcgcgttg gcggtaaaca gaaagggatc ttactcgcg accgcaaacg gaagtccgcy 1740  
gctttctgcy tgcaaaaacg ctggactggc atgaacttgc gtgaaaaacc gcagcagggc 1800  
ggcaacaact ga 1812

<210> 15  
<211> 324  
<212> ADN  
5 <213> Virus del mosaico de la coliflor

<400> 15  
ccgatcctac ctgtcacttc atcaaaagga cagtagaaaa ggaaggtggc acctacaaat 60  
gccatcattg cgataaagga aaggctatca ttcaagatgc ctctgccgac agtgggtccca 120  
aagatggacc cccaccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt 180  
caaagcaagt ggattgatgt gatacttcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact 240  
atccttcgca agacccttcc tctatataag gaagttcatt tcatttggag aggacacgct 300  
gaaatcacca gtctctctct acaa 324

<210> 16  
<211> 1399  
10 <212> ADN  
<213> *Oryza sativa*

<400> 16

ES 2 743 917 T3

tcgaggtcat	tcatatgctt	gagaagagag	tcgggatagt	ccaaaataaa	acaaggtaa	60
gattacctgg	tcaaaagtga	aaacatcagt	taaaagggtg	tataaagtaa	aatatcggt	120
ataaaaggtg	gcccaaagtg	aaatttactc	ttttctacta	ttataaaaat	tgaggatggt	180
tttgtcggta	ctttgatacg	tcatttttgt	atgaattggt	ttttaagttt	attcgctttt	240
ggaaatgcat	atctgtattt	gagtcggggt	ttaagttcgt	ttgcttttgt	aaatacagag	300
ggatttgtat	aagaaatatac	tttagaaaa	cccatatgct	aatttgacat	aatttttgag	360
aaaaatatat	attcaggcga	attctcaca	tgaacaataa	taagattaaa	atagctttcc	420
cccgttgcag	cgcatgggta	tttttctag	taaaaataaa	agataaactt	agactcaaaa	480
catttcaaaa	aacaaccocct	aaagttcota	aagcccaaag	tgctatccac	gatccatagc	540
aagcccagcc	caaccacaacc	caaccacaacc	caccocagtc	cagccaactg	gacaatagtc	600
tccacacccc	cccaactatca	cogtgagttg	tccgcacgca	cgcacgtct	cgcagccaaa	660
aaaaaaaaaga	aagaaaaaaaa	agaaaaagaa	aaaacagcag	gtgggtccgg	gtcgtggggg	720
ccggaaacgc	gaggaggatc	gcgagccagc	gacgaggccg	gcctccctc	cgcttccaaa	780
gaaacgcccc	ccatcgccac	tatatacata	ccccccctc	tcctcccatc	cccccaacc	840
taccaccacc	accaccacca	cctocacctc	ctccccctc	gctgcgggac	gacgagctcc	900
tccccctcc	ccctccgccc	cgcgcgcgcc	ggtaaccacc	cgcocctct	cctctttctt	960
tctcctttt	tttttcogtc	toggtctoga	tctttggcct	tggtagtttg	ggtgggagag	1020
aggcggcttc	gtgcgcgccc	agatcgggtc	gcgggagggg	cgggatctcg	cggtggggc	1080
tctcgcggc	gtggatccgg	cccgatctc	gcggggaatg	ggctctcgg	atgtagatct	1140
gcgatccgcc	gttgttgggg	gagatgatgg	ggggtttaa	attccgccg	tgctaaacaa	1200
gatcaggaag	aggggaaaag	ggcactatgg	tttatatttt	tatatatttc	tgctgcttcc	1260
tcaggcttag	atgtgctaga	tctttcttcc	ttctttttgt	gggtagaatt	tgaatccctc	1320
agcattgttc	atcggtagtt	ttcttttca	tgatttgtga	caaatgcagc	ctcgtgogga	1380
gcttttttgt	aggtagaag					1399

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN seleccionada de entre el grupo que consiste en:
  - a) una secuencia con al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6, u 8, en la que la secuencia tiene una actividad promotora;
  - 5 b) una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6, u 8; y
  - c) un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6, u 8, en la que el fragmento tiene actividad promotora;
 en la que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula de polinucleótido heteróloga que se puede transcribir.
2. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en el que dicho fragmento comprende la SEQ ID NO: 2.
- 10 3. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la molécula de polinucleótido heteróloga que se puede transcribir comprende un gen de interés agronómico.
4. La molécula de ADN de la reivindicación 3, en la que
  - (i) el gen de interés agronómico transmite tolerancia a los herbicidas en las plantas; o
  - (ii) el gen de interés agronómico transmite resistencia a las plagas en las plantas.
- 15 5. Una célula vegetal transgénica que comprende una molécula de ADN heteróloga que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en:
  - a) una secuencia con al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6, u 8, en la que la secuencia tiene una actividad promotora;
  - 20 b) una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6, u 8; y
  - c) un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 6, u 8, en la que el fragmento tiene actividad promotora;
 en la que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula de polinucleótido heteróloga que se puede transcribir.
6. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 5, en la que dicha célula vegetal transgénica
  - (i) es una célula de una planta monocotiledónea; o
  - 25 (ii) es una célula de una planta dicotiledónea.
7. Una planta transgénica o parte de la misma, o una semilla transgénica, que comprende la molécula de ADN de la reivindicación 1.
8. Una progenie de planta de una planta transgénica de la reivindicación 7, o una parte de la misma, en el que la progenie de la planta o parte de la misma comprende dicha molécula de ADN.
- 30 9. Un casete transgénico que comprende una molécula de ADN seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 6 y 8, en el que la molécula de ADN está unida operativamente a una secuencia codificante heteróloga que está unida operativamente a una 3' UTR seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 11, 12, y 13.
- 35 10. El casete transgénico de la reivindicación 9 que comprende la molécula de ADN presentada como SEQ ID NO: 1, en el que la molécula de ADN está unida operativamente a una secuencia codificante heteróloga que está unida operativamente a la 3' UTR presentada como SEQ ID NO: 10.
11. El casete transgénico de la reivindicación 9 que comprende la molécula de ADN presentada como SEQ ID NO: 6, en el que la molécula de ADN está unida operativamente a una secuencia codificante heteróloga que está unida operativamente a una 3' UTR seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11 y 12.
- 40 12. El casete transgénico de la reivindicación 9 que comprende la molécula de ADN presentada como SEQ ID NO: 8, en el que la molécula de ADN está unida operativamente a una secuencia codificante heteróloga que está unida operativamente a una 3' UTR seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12 y 13.
- 45 13. Un procedimiento de expresión de una molécula de polinucleótido que se puede transcribir por el que se obtiene una planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 7 y del cultivo de dicha planta, en la que se expresa el polinucleótido que se puede transcribir.

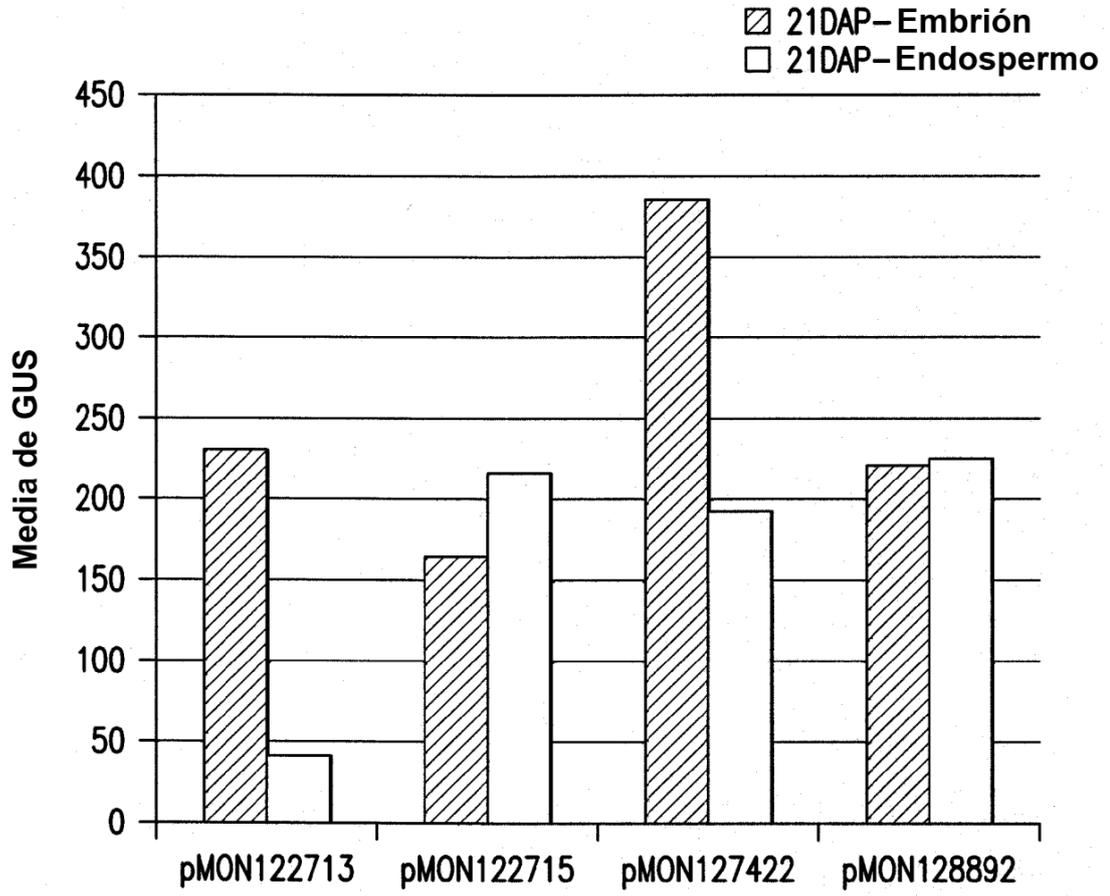


FIG.1

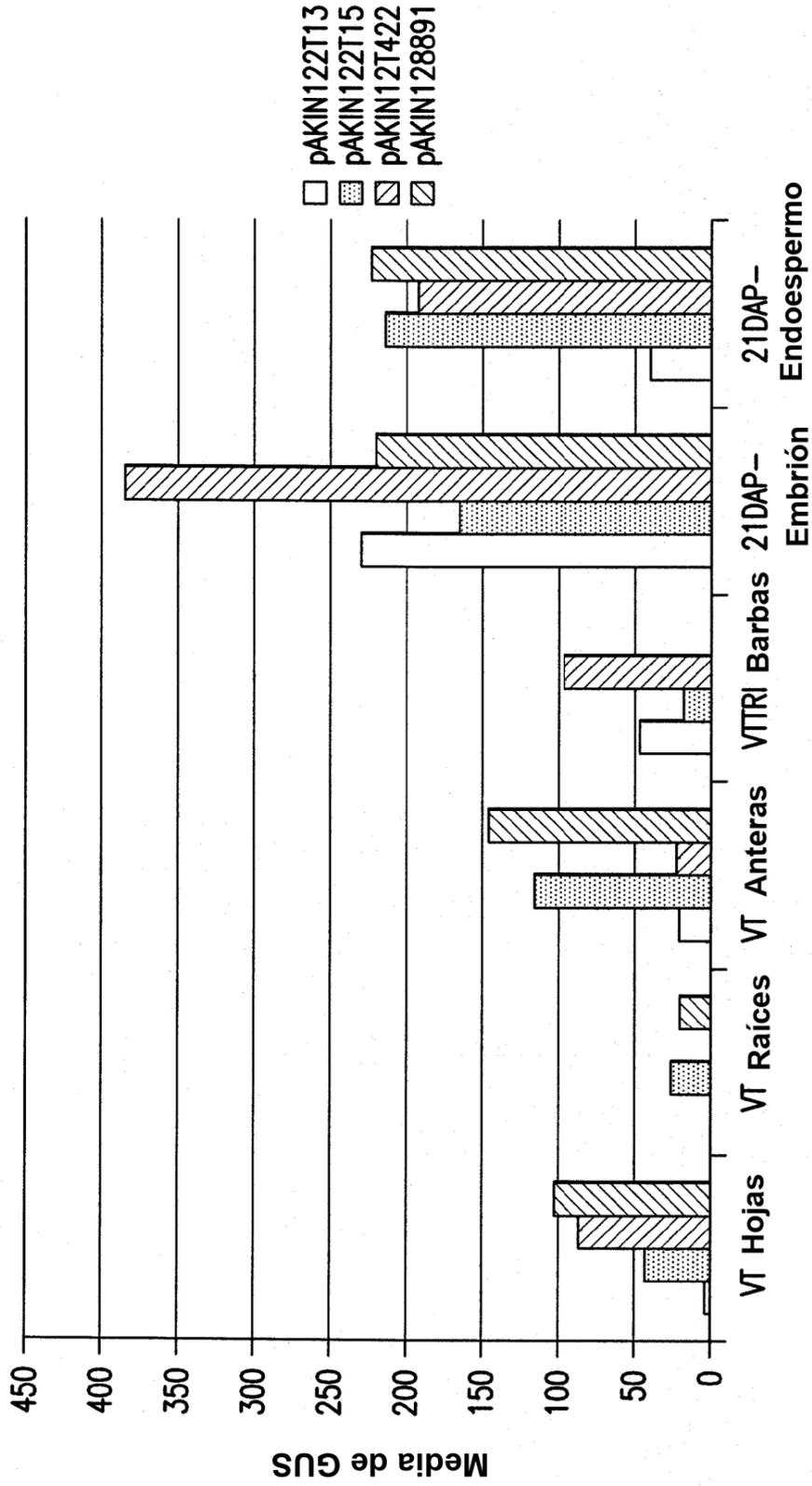


FIG.2