

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 898**

51 Int. Cl.:

A01H 1/00 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014 PCT/US2014/024511**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14159632**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014 E 14774111 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2966981**

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

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361785245 P

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

29.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FLASINSKI, STANISLAW;
ZHANG, JUN y
ZHAO, SULING**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 769 898 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 invención se refiere al campo de la biología molecular, la modificación genética de plantas, y moléculas de ADN útiles para la modulación de la expresión genética en plantas.

Antecedentes

10 Los elementos reguladores son elementos genéticos que regulan la actividad genética modulando la transcripción de una molécula de ADN 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.

Sumario de la invención

15 La invención proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada de entre el grupo que consiste en: (a) una secuencia de ADN con al menos aproximadamente un 95 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17 de longitud completa, en la que la secuencia de ADN tiene la actividad promotora de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17; (b) una secuencia de DNA que comprenda cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17; y (c) un fragmento que comprende al menos 600 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17, en las que el fragmento tiene la actividad promotora de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17; y en la que la secuencia de ADN está unida operativamente a una moléculas de ADN heteróloga que se puede transcribir. En ciertas realizaciones, la molécula de ADN heteróloga que se puede transcribir comprende un gen de interés agronómico y el gen de interés agronómico transmite tolerancia a los herbicidas o resistencia a las plagas a las plantas.

25 En otro aspecto, se proporciona adicionalmente una célula vegetal transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada de entre el grupo que consiste en: (a) una secuencia de ADN con al menos aproximadamente un 95 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17 de longitud completa, en la que la secuencia de ADN tiene la actividad promotora de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17; (b) una secuencia de DNA que comprenda cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17; y (c) un fragmento que comprende al menos 600 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17, en las que el fragmento tiene la actividad promotora de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17; y en la que la secuencia de ADN está unida operativamente a una moléculas de ADN heteróloga que se puede transcribir. En realizaciones específicas, la célula vegetal transgénica es una célula vegetal de monocotiledónea o una célula vegetal de dicotiledónea. También se proporciona por la invención una planta transgénica, o parte de la misma que comprende la molécula de ADN recombinante. En realizaciones particulares, también se proporciona por la invención una progenie vegetal de la planta transgénica, o parte de la misma o una semilla transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante.

35 También se proporciona en el presente documento un procedimiento de provisión de una planta transgénica transformando una célula vegetal con una molécula de ADN recombinante de la invención para producir una célula vegetal transformada, y la regeneración de la célula vegetal transformada para producir una planta transgénica.

40 La planta transgénica puede ser una planta monocotiledónea. En una realización, la planta monocotiledónea se selecciona de entre el grupo que consiste en Maíz (*Zea mays*), Arroz (*Oryza sativa*), Trigo (*Triticum*), Cebada (*Hordeum vulgare*), Sorgo (*Sorghum spp.*), Mijo, Mijo perla (*Pennisetum glaucum*), Mijo de dedo (*Eleusine coracana*), Mijo común (*Panicum miliaceum*), Moha itálica (*Setaria italica*), Avena (*Avena sativa*), Triticale, Centeno (*Secale cereale*), Poáceas (*Digitaria*), Cebollas (*Allium spp.*), Piña (*Ananas spp.*), Céspedes, Caña de azúcar (*Saccharum spp.*), Palma (*Arecaceae*), Bambú (*Bambuseae*), Banana (*Musaceae*), familia de Gengibres (*Zingiberaceae*), Lirios (*Lilium*), Narcisos (*Narcissus*), Iris (*Iris*), Amarilis, Orquideas (*Orchidaceae*), Cañas, Jacintos (*Hyacinthoides*), y Tulipanes (*Tulipa*). La planta transgénica también puede ser una planta dicotiledónea. En una realización, la planta dicotiledónea se selecciona de entre el grupo que consiste en Soja (*Glycine max*), Soja silvestre (*Glycine soja*), Algodón (*Gossypium*), Tomate (*Solanum lycopersicum*), Pimienta (*Piper*), Calabacín (*Cucurbita*), Guisante (*Pisum sativum*), Alfalfa (*Medicago sativa*), Medicago truncatula, Alubias (*Phaseolus*), Garbanzo (*Cicer arietinum*), Girasol (*Helianthus annuus*), Patata (*Solanum tuberosum*), Maní (*Arachis hipogea*), Quinoa, trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), Algarrobo (*Ceratonia siliqua*), Remolacha (*Beta vulgaris*), Espinaca (*Spinacia oleracea*), y Pepino (*Cucumis sativus*).

Breve descripción de las figuras

55 Las FIG. 1a-1c muestran un alineamiento entre la secuencia codificante de la B-glucuronidasa (GUS) de *E. coli* (CR-Ec.uidA-1:1:4, SEQ ID NO: 31) y la secuencia codificante de GUS de *E. coli* con el codón rediseñado (CR-Ec.uidA_nno-1:1:1, SEQ ID NO: 30). Los nucleótidos idénticos en el alineamiento se indican mediante un asterisco.

Breve descripción de las Secuencias

Las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23 son secuencias promotoras.

Las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 son secuencias líder.

Las SEQ ID NO: 25-28 son secuencias de cebador de amplificación.

5 Las SEQ ID NO: 29 y 30 son secuencias codificantes de GUS con el codón rediseñado. Las SEQ ID NO: 29 comprende un intrón procesable, mientras que la SEQ ID NO: 30 es una secuencia codificante contigua.

La SEQ ID NO: 31 es la secuencia codificante de β -glucuronidasa nativa de *Escherichia coli*.

La SEQ ID NO: 32 es una secuencia codificante de GUS con un intrón procesable basado en la β -glucuronidasa de *E. coli* de SEQ ID NO: 31.

10 Las SEQ ID NO: 33, 39 y 40 son secuencias de UTR 3'.

Las SEQ ID NO: 34-37, 41 y 44 son secuencias de grupos de elementos transcripcionales reguladores de la expresión (EXP) que comprenden una secuencia promotora unida operativamente en 5' a una secuencia líder que está unida operativamente en 5' a una secuencia de intrón, o en el caso de la SEQ ID NO: 44 una secuencia promotora unida operativamente en 5' a una secuencia líder.

15 La SEQ ID NO: 38 es una secuencia de intrón.

Las SEQ ID NO: 42 y 44 son secuencias codificantes para las luciferasas proteicas derivadas de *Photinus pyralis* y *Renilla reniformis*, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

20 La invención proporciona moléculas de ADN que tienen actividad genética reguladora en plantas como se ha descrito anteriormente. Estas moléculas de ADN son capaces, por ejemplo, de afectar la expresión de una molécula de ADN que se puede transcribir a la que se unen operativamente en los tejidos vegetales, y, por lo tanto, de regular selectivamente la expresión genética de un transgén unido operativamente en plantas transgénicas. La invención también proporciona procedimientos de modificación, producción y utilización de los mismos. La invención también proporciona composiciones que incluyen células vegetales, plantas, partes de plantas, y semillas transgénicas que
25 contienen moléculas de ADN recombinante de la invención, y procedimientos para preparar y utilizar las mismas.

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

Moléculas de ADN

30 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 desoxirribonucleótido. 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 WIPO ST.25
35 (1998), Apéndice 2, Tablas 1 y 3.

Como se utiliza en el presente documento, una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que comprende una combinación de moléculas de ADN que no existirían juntas en la naturaleza sin la intervención humana. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante puede ser una molécula de ADN que comprende al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre ellas, una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que se desvía de las secuencias de ADN que existen en la naturaleza, o una molécula de ADN que se ha incorporado en un
40 ADN de una célula huésped mediante transformación genética.

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 de secuencias óptimo se crea mediante el alineamiento manual de dos secuencias, por ejemplo, una
45 secuencia de referencia y otra secuencia de ADN, para maximizar el número de coincidencias de nucleótidos en el alineamiento de secuencias con un inserciones, eliminaciones o huecos adecuados de nucleótidos internos. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia de ADN proporcionada como las SEQ ID NO: 1-20.

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
50

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, una realización de la invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia que cuando se alinea óptimamente con una secuencia de referencia tiene al menos aproximadamente un 85 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 86 por ciento de identidad, al menos aproximadamente 87 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 88 por ciento de identidad al menos aproximadamente un 89 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 90 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 91 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 92 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 93 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 94 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 95 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 96 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 97 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 98 por ciento de identidad, al menos aproximadamente un 99 por ciento de identidad, o al menos aproximadamente un 100 por ciento de identidad respecto a la secuencia de referencia.

Elementos reguladores

Los elementos reguladores tales como promotores, líderes, amplificadores, intrones, y regiones de terminación de la transcripción (o UTR 3') son una parte integral de la expresión total de genes en células vivas. La expresión "elemento regulador" como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de ADN que tienen actividad reguladora genética. La expresión "actividad genética reguladora" como se utiliza en el presente documento, se refiere a la capacidad para afectar la expresión de una molécula de ADN que se puede transcribir a la que se une operativamente, por ejemplo, afectando a la transcripción y/o traducción de la molécula de ADN que se puede transcribir a la que se une operativamente. Los elementos reguladores, tales como los promotores, líderes, amplificadores, intrones y UTR 3' que funcionan en plantas son por lo tanto útiles para la modificación de fenotipos vegetales mediante modificación genética.

Como se utiliza en el presente documento, un "grupo de elementos reguladores de la expresión" o secuencia "EXP" puede referirse a un grupo de elementos reguladores unidos operativamente, tales como amplificadores, promotores, líderes, e intrones. Por lo tanto, un grupo de elementos 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 en 5' a una secuencia de intrón.

Los elementos reguladores se pueden caracterizar por su patrón de expresión genética, por ejemplo, efectos positivos y/o negativos, tales como de expresión constitutiva, temporal, espacial, de desarrollo, tisular, ambiental, fisiológico, patológico, de ciclo celular, y/o expresión de respuesta química, y cualquier combinación de los mismos, así como mediante indicaciones cuantitativas o cualitativas. 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 o reguladora diferente, tal como un ARN de cadena doble (ARNds), un ARN de transferencia (ARNt), un ARN ribosómico (ARNr) y un microARN (miARN), y similares.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "expresión proteica" es cualquier patrón de traducción de una molécula de ARN transcrita 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.

Un promotor puede ser útil como elemento regulador para la modulación de la expresión de una molécula de ADN que se puede transcribir a la que se une operativamente. 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, tales como factores de transcripción activos trans, para iniciar la transcripción. Un promotor se puede originar a partir de la región no traducida 5' (UTR 5') de un gen. De manera alternativa, los promotores pueden ser moléculas de ADN producidas por síntesis o modificadas. Los promotores también pueden ser quiméricos. Los promotores quiméricos se producen mediante la fusión de dos o más moléculas heterólogas de ADN. Los promotores útiles en la práctica de la presente invención incluyen las SEQ ID NO: 13, 15, y 17, incluyendo fragmentos o variantes de las mismas como se ha descrito anteriormente. Las variantes o derivados comprenden actividad promotora, es decir, son capaces de actuar como un promotor en una célula huésped, tal como en una planta transgénica. En realizaciones específicas adicionales, un fragmento se puede definir como el que presenta la actividad promotora que posee la molécula promotora de partida de la que se deriva.

En una realización, los fragmentos de una secuencia promotora desvelada en el presente documento se proporcionan como se ha descrito anteriormente. Los fragmentos promotores pueden comprender actividad promotora, como se ha descrito anteriormente, y pueden ser útiles solos o en combinación con otros promotores o fragmentos de promotor, tal como en la construcción de promotores quiméricos.

Las composiciones derivadas de cualquiera de los promotores que se presentan en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19, tales como con eliminaciones internas o en 5', por ejemplo, se pueden producir 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. Las composiciones derivadas de cualquiera de los promotores que se presentan en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, y 19 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 específicos temporales (tales como, pero sin limitarse a, los de ritmo circadiano) sobre la expresión. Cualquiera de los promotores que se presentan en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, y 19 y fragmentos o amplificadores derivados de las mismas para producir composiciones de elementos transcripcionales reguladores quiméricos que comprendan cualquiera de los promotores que se presentan en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, y 19 y los fragmentos o amplificadores derivados de las mismas unidos operativamente a otros amplificadores y promotores.

De acuerdo con la invención, un promotor o fragmento de promotor se puede analizar en cuanto a la presencia de elementos promotores conocidos, es decir, las 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 puede ser utilizada por un experto en la técnica para diseñar variantes del promotor que tengan un patrón de expresión similar al promotor original.

Como se utiliza en el presente documento, el término "líder" se refiere a una molécula de ADN a partir de una región no traducida 5' (5' UTR) 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 por síntesis o modificados. Un líder puede ser utilizarse como elemento regulador en 5' para la modulación de la expresión de una molécula de ADN que se puede transcribir a la que se une operativamente. Las moléculas líder se pueden utilizar como un promotor heterólogo o con su promotor nativo. Las moléculas promotoras de la presente invención pueden por lo tanto estar unidas operativamente a su líder nativo o pueden estar unidas operativamente a un líder heterólogo. Los líderes útiles en la práctica de la invención incluyen las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, y 20 o fragmentos o variantes de las mismas. En realizaciones específicas, dichas secuencias de ADN se pueden definir como que son capaces de actuar como un líder en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo, una célula vegetal transgénica. En una realización, dichas secuencias de ADN se descifran como que comprenden actividad líder.

Las secuencias líder (UTR 5') que se presentan como las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, y 20 pueden estar comprendidas por elementos reguladores o puede adoptar estructuras secundarias que pueden tener un efecto sobre la transcripción o traducción de una molécula de ADN a la que se unen operativamente. Las secuencias líder que se presentan como las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, y 20 se pueden utilizar de acuerdo con la invención para producir elementos reguladores quiméricos que afecten a la transcripción o traducción de una molécula de ADN a la que se unen operativamente. Además, las secuencias líder que se presentan como las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, y 20 se pueden utilizar de acuerdo con la invención para producir elementos reguladores quiméricos que afecten a la transcripción o traducción de una molécula de ADN a la que se unen operativamente.

Como se utiliza en el presente documento, el término "intrón" se refiere a una molécula de ADN que se puede identificar en un gen y se puede definir en general como una región recortada durante el procesamiento del ARN mensajero (ARNm) antes de la traducción. De manera alternativa, un intrón pueden ser un elemento de ADN producido por síntesis o modificado. Un intrón puede contener elementos amplificadores que efectúen la transcripción de genes unidos operativamente. Un intrón puede ser utilizarse como elemento regulador para la modulación de la expresión de una molécula de ADN que se puede transcribir a la que se une operativamente. Una construcción puede comprender un intrón, y el intrón puede ser heterólogo o no con respecto a la molécula de ADN que se puede transcribir. Ejemplos de intrones en la técnica, incluyen el intrón de actina del arroz y el intrón HSP70 del maíz.

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., Plant Mol. Biol. 15:913-920, 1990). Los intrones que se sabe que estimulan la expresión en plantas se han identificado en los genes del maíz (por ejemplo, tubA1, Adh1, Sh1, y Ubi1), en los genes del arroz (por ejemplo, tpi) y en genes de plantas dicotiledóneas como las de petunia (por ejemplo, rbcS), patata (por ejemplo, st-lsl) y de *Arabidopsis thaliana* (por ejemplo, ubq3 y pat1). Se ha demostrado que las eliminaciones o mutaciones dentro de los sitios de corte y empalme de un intrón reducen la expresión genética, indicando que el corte y empalme puede ser necesario para el IME. Sin embargo, el corte y empalme *per se* puede no ser necesario, ya que se ha presentado IME en plantas dicotiledóneas mediante mutaciones puntuales dentro de los sitios de corte y empalme del gen pat1 de *A. thaliana*. 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.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de terminación de la transcripción en 3'", "región no traducida 3'" o UTR 3'" en el presente documento se refiere a una molécula de ADN que se utiliza durante la transcripción de la región no traducida de la parte 3' de una molécula de ARNm. La región no traducida 3' de una molécula de ARNm puede generarse mediante escisión específica y poliadenilación 3', también conocida como cola poliA. Una UTR 3' puede estar unida operativamente a y localizarse corriente debajo de una molécula de ADN que se puede transcribir y puede incluir 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 la nopalina sintasa; la región 3' de la hsp17 del trigo; la región 3' de la subunidad pequeña rubisco del guisante, la región 3' E6 del algodón, y la UTR 3' de coixina.

5 La utilización de las UTR 3' normalmente es beneficioso para la expresión recombinante de moléculas de ADN específico. Una UTR 3' débil tiene el potencial para generar una translectura, que puede afectar a la expresión de la molécula de ADN localizada en los casetes de expresión vecinos. El control apropiado de la terminación de la transcripción puede prevenir la translectura en secuencias de ADN (por ejemplo, en otros casetes de expresión) localizadas corriente abajo y pueden permitir adicionalmente el reciclado eficaz de ARN polimerasa 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 directamente el nivel total de transcripción. Posteriormente a la terminación de la transcripción, el ARNm maduro se libera del sitio de síntesis y la matriz 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. Adicionalmente, la predicción de UTR 3' funcionales y eficaces mediante procedimientos bioinformáticos es difícil ya que son secuencias de ADN no conservadas lo que haría posible la predicción fácil de una UTR 3' eficaz.

Desde un punto de vista práctico, normalmente es beneficioso que una UTR 3' que se utilice en un casete de expresión posea ciertas características. La UTR 3' debería ser capaz de terminar eficiente y eficazmente la transcripción de la molécula de ADN que se puede transcribir y evitar la translectura de la transcripción en cualquier secuencia de ADN vecina, que puede estar comprendida por otro casete de expresión, como en el caso de múltiples casetes de expresión que residen en un ADN de transferencia (T-ADN), o en la vecindad del ADN cromosómico en la que se ha insertado el T-ADN. La UTR 3' no debería producir una reducción de la actividad transcripcional transmitida por el promotor, líder, amplificadores e intrones que se utilizan para dirigir la expresión de la molécula de ADN. En la biotecnología vegetal, la UTR 3' a menudo se utiliza para cebar las reacciones de amplificación del ARN transcrito inversamente extraído de la planta transformada y que se utiliza para: (1) evaluar la actividad transcripcional o expresión de los casetes de expresión una vez que se integran en el cromosoma de la planta; (2) evaluar el número de copias de inserciones dentro del ADN vegetal; y (3) evaluar la cigosis de la semilla resultante después del cruzamiento. La UTR 3' también se utiliza en las reacciones de amplificación del ADN extraído de la planta transformada para caracterizar que el casete insertado está intacto.

30 Como se utiliza en el presente documento, el término "amplificador" o "elemento amplificador" se refiere a un elemento regulador actuante *cis*, conocido como 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 ADN a la que se une 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 de ADN equivalente. Un promotor o fragmento de promotor puede comprender naturalmente uno o más elementos amplificadores que afectan a la transcripción de una secuencia de ADN a la que se une operativamente. Un elemento amplificador también se puede fusionar con un promotor para formar un elemento *cis* promotor quimérico, que transmite un aspecto de la modulación total de la expresión genética.

Se cree que muchos elementos promotores amplificadores se unen a proteínas de unión al ADN y/o afectan a 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 una reacción en cadena de polimerasa (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 conocidos en la técnica. 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. Por lo tanto, el diseño, construcción, y uso de elementos amplificadores de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento para la modulación de la expresión de moléculas de ADN que se pueden transcribir a las que se unen operativamente están englobados en la invención.

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

5 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. Por lo tanto, el diseño, construcción, y uso de promotores quiméricos de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento para la modulación de la expresión de moléculas de polinucleótido que se pueden transcribir a las que se unen operativamente están englobados en la invención.

10 Como se utiliza en el presente documento, el término "variante" se refiere a una segunda molécula de ADN, tal como un elemento regulador que es similar en composición, pero no idéntica a, una primera molécula de ADN, y en la que la segunda molécula de ADN sigue manteniendo la funcionalidad general, es decir, el mismo o similar patrón de expresión, de la primera molécula de ADN. Una variante puede ser una versión acortada o truncada de la primera molécula de ADN y/o una versión alterada de la secuencia de ADN de la primera molécula de ADN, tal como la que tenga sitios de restricción enzimática de y/o eliminaciones, sustituciones y/o inserciones internas diferentes. Las "variantes" de elementos reguladores también engloban variantes que aparecen por mutaciones que se producen naturalmente en la transformación celular bacterianas y vegetales. En la invención, se puede utilizar una secuencia como se ha descrito anteriormente para crear variantes que sean similares en composición, pero no idénticas a la secuencia de ADN del 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 invención está bien dentro de la experiencia habitual en la técnica a la luz de la divulgación y está englobada dentro del ámbito de la divulgación.

20 Los elementos reguladores quiméricos se pueden diseñar para que comprendan distintos elementos constituyentes que pueden estar unidos 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. Los distintos elementos reguladores quiméricos resultantes puede estar comprendidos por los mismos, o variantes de los mismos elementos constituyentes, pero se diferencian en la secuencia de ADN o secuencias de ADN que comprenden la secuencia de ADN de unión o secuencias que permitan que las partes constituyentes estén unidas operativamente. En la invención, una secuencia de ADN como se ha descrito anteriormente puede proporcionar una secuencia de referencia de un elemento regulador, 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 vegetales.

35 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 DNA molécula de partida.

Construcciones

40 Como se utiliza en el presente documento, el término "construcción" significa cualquier molécula de ADN recombinante tal como un plásmido, cósmido, virus, fago, o molécula de ADN o ARN de replicación autónoma, fago, o molécula de polinucleótido de ADN o ARN lineal o circular, derivada de cualquier fuente, capaz de la integración genómica o la replicación autónoma, que comprende una molécula de ADN, donde al menos una molécula de ADN se ha unido a la otra molécula de ADN de una manera funcionalmente operativa, es decir, están unidas operativamente. Como se utiliza en el presente documento, el término "vector" significa cualquier construcción que pueda utilizarse con fines de transformación, es decir, la introducción de ADN o ARN heterólogos en una célula huésped. Una construcción incluye normalmente uno o más casetes de expresión. Como se utiliza en el presente documento, un "casete de expresión" se refiere a una molécula de ADN que comprende al menos una molécula de ADN que se puede transcribir unida operativamente a uno o más elementos reguladores, normalmente al menos un promotor y una UTR 3'.

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

55 Las construcciones de la invención pueden proporcionarse, en una realización, como construcciones plasmídicas inductoras de tumor (Ti) de doble límite que tienen regiones 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 la matriz del ADN plasmídico 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 estreptomycin, o un marcador genético seleccionable 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 en la invención 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 ADN que se puede transcribir se transcribe en una molécula de ARNm funcional que se traduce y expresa como una proteína. Para la práctica de la invención, las composiciones convencionales y procedimientos para la preparación y utilización de las construcciones y las células huésped son bien conocidas por el experto en la técnica. 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 Ti de *A. tumefaciens* y el vector de control de transferencia pCaMVCN.

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 características reguladoras deseables. En una realización, las construcciones de la invención comprenden al menos un elemento regulador unido operativamente a una molécula de ADN que se puede transcribir unida operativamente a una UTR 3'.

Las construcciones de la invención pueden incluir cualquier promotor o líder que se proporciona en el presente documento o se conozca en la técnica. Por ejemplo, un promotor de la invención puede estar unido operativamente a un líder no traducido heterólogo en 5' tal como uno derivado de un gen de la proteína de choque térmico. De manera alternativa, un líder de la invención puede estar unido operativamente a un promotor heterólogo tal como el promotor de transcripción 35S del virus del mosaico de la coliflor.

Los casetes de expresión también pueden incluir una secuencia codificante de un péptido de tránsito que codifica un péptido que sea útil para el direccionamiento subcelular de una proteína unida operativamente, particularmente a un cloroplasto, leucoplasto y otro orgánulo plastídico; mitocondria, peroxisoma, vacuola; o una localización extracelular. 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, pero no se limitan a, los que se asocian con la subunidad pequeña (SSU) de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, la proteína I y la proteína II del complejo cosecha-luz, tiorredoxina F, enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS). Los péptidos de tránsito de cloroplasto se describen, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º 7.193.133. Se ha demostrado que las proteínas no cloroplásticas se pueden dirigir al cloroplasto mediante la expresión de un CTP heterólogo unido operativamente al transgén que codifica proteínas no cloroplásticas.

Moléculas de ADN que se pueden transcribir

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de ADN que se puede transcribir" se refiere a cualquier molécula de ADN capaz de ser transcrita en una molécula de ARN, que incluye, pero no se limita a, las que tienen secuencias codificantes de proteínas y las que producen moléculas de ARN que tienen secuencias útiles para la supresión genética. El tipo de molécula de ADN puede incluir, pero no se limita a, una molécula de ADN de la misma planta, una molécula de ADN de otra planta, una molécula de ADN de un organismo diferente, o una molécula de ADN sintética, tal como una molécula de ADN que contenga un mensaje antisentido de un gen, o una molécula de ADN que codifique un transgén artificial, sintético o una versión de un transgén modificada de otra manera. Las moléculas de ADN que se pueden transcribir ejemplares para la incorporación en construcciones de la invención incluyen, por ejemplo, las moléculas de ADN o genes de una especie distinta de la especie en la que se incorpora la molécula de ADN o los genes que se originan, o están presentes en la misma especie, pero se incorporan en células receptoras por procedimientos de modificación genética más que por técnicas de cruzamiento clásicas.

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

Un elemento regulador, tal como un promotor de la invención, puede estar unido operativamente a una molécula de ADN que se puede transcribir que sea heteróloga con respecto al elemento regulador. Como se utiliza en el presente documento, el término "heterólogo" se refiere a la combinación de dos o más moléculas de ADN cuando dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, las dos moléculas de ADN se pueden derivar de diferentes especies y/o las dos moléculas de ADN se pueden derivar de diferentes genes, por ejemplo, diferentes genes de la misma especie, o los mismos genes de diferentes especies. Un elemento regulador es por lo tanto heterólogo con respecto a una molécula de ADN 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 ADN que se puede transcribir no existe naturalmente unida operativamente al elemento regulador.

La molécula de ADN que se puede transcribir puede ser en general cualquier molécula de ADN de la que se desee la expresión de una transcripción. Dicha expresión de una transcripción 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 ADN que se puede transcribir puede diseñarse para producir en último término una disminución de la expresión de un gen o proteína específica. En una realización, esto se puede conseguir utilizando una molécula de ADN 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. Cualquier gen se puede regular negativamente de esta manera, y, en una realización, se puede diseñar una molécula de ADN que se puede transcribir para la supresión de un gen específico mediante la expresión de una molécula de dsARN, ARNip o miARN.

Por lo tanto, una realización de la invención es una molécula de ADN recombinante que comprende un elemento regulador de la invención como se ha descrito anteriormente unido operativamente a una molécula de ADN que se puede transcribir de manera que module la transcripción de la molécula de ADN 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 transgénica. En una realización, la molécula de ADN que se puede transcribir comprende una región codificante de proteína de un gen y en otra realización, la molécula de ADN que se puede transcribir comprende una región antisentido de un gen.

Genes de interés agronómico

Una molécula de ADN que se puede transcribir puede ser un gen de interés agronómico. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "genes de interés agronómico" se refiere a una molécula de ADN que se puede transcribir que, cuando se expresa en un tejido vegetal particular, célula o tipo celular, transmite una característica deseable. El producto de un gen de interés agronómico puede actuar dentro de la planta con el fin de afectar la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo, rendimiento, composición del grano, perfil nutricional, enfermedad o resistencia a plagas o enfermedades, y/o tolerancia ambiental o química o puede actuar como un agente plaguicida en la dieta de una plaga que se alimenta en la planta. En una realización de la invención, se incorpora un elemento regulador de la invención en una construcción de manera que el elemento regulador se une operativamente a una molécula de ADN que se puede transcribir que sea un gen de interés agronómico, en una planta transgénica que contenga dicha construcción, la expresión del gen de interés agronómico puede transmitir un rasgo agronómico beneficioso. Un rasgo agronómico beneficioso puede incluir, pero no se limita a, tolerancia a herbicidas, control de insectos, rendimiento modificado, resistencia a enfermedades, resistencia a agentes patógenos, crecimiento y desarrollo vegetativo modificado, contenido de almidón modificado, contenido de aceites modificado, contenido en ácidos grasos modificado, contenido proteico modificado, maduración de los frutos modificada, aumento de la nutrición animal y humana, producciones de biopolímeros, resistencia al estrés ambiental, péptidos farmacéuticos, mejores cualidades de procesamiento, sabor mejorado, utilidad de producción de semillas híbridas, producción mejorada de fibra, y producción de biocombustible deseable.

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

De manera alternativa, un gen de interés agronómico puede afectar las características o fenotipos de las plantas 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. N.º

5.107.065), ARN inhibidor ("ARNi", incluyendo la modulación de la expresión genética mecanismos mediados por miARN, ARNip, ARNip activo trans, y sARN de fase, por ejemplo, como se describe en las solicitudes publicadas U.S. 2006/0200878 y U.S. 2008/0066206 y en la solicitud de patente de EE. UU. 11/974.469); o mecanismos mediados por cosupresión. El ARN también puede ser una molécula de ARN catalítica (por ejemplo, una ribozima, o ribointerruptor; véase, por ejemplo, el documento 2006/0200878) modificada para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. Se conocen procedimientos en la técnica para la construcción y la introducción de construcciones en una célula de manera que la molécula de ADN que se puede transcribir se transcriba en una molécula que sea capaz de producir la supresión genética.

La expresión de una molécula de ADN 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 y composiciones aisladas de plagas de nematodos. Las plagas de las plantas incluyen, pero no se limitan a, las plagas de artrópodos, plagas de nematodos, y plagas fúngicas o microbianas.

Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos transgénicos también se pueden utilizar con los elementos reguladores de la invención. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "marcador genético transgénico" se refiere a cualquier molécula de ADN que se puede transcribir cuya expresión en una planta, tejido o célula transgénicos, o falta de la misma, puede explorarse o valorarse de alguna manera. Los genes de los marcadores genéticos, y sus técnicas de selección y exploración asociadas, para su uso en la práctica de la invención son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, moléculas de ADN que se pueden transcribir que codifican la β -glucuronidasa (GUS), la proteína fluorescente verde (GFP), proteínas que transmiten resistencia a antibióticos, y proteínas que transmiten tolerancia a herbicidas.

β -Glucuronidasa

El gen de la β -glucuronidasa (GUS) aislado de la *Escherichia coli* K-12 es uno de los genes indicadores utilizados más ampliamente en biotecnología vegetal. El gen de GUS de *E. coli*, uidA, es parte del operón GUS del cromosoma bacteriano. Está inducido por una amplia variedad de β -D-glucurónidos. La enzima GUS es un exohidrolasa que cataliza la hidrólisis de β -D-glucurónidos en ácido D-glucurónico y la aglicona. La *E. coli* vive en el tracto digestivo de los vertebrados, incluido el hombre. Los vertebrados utilizan la ruta de glucuronidación para la detoxificación de xenobióticos y compuestos de desecho endógenos tales como los esteroides, alcoholes alifáticos, fenol, ácidos carboxílicos, azúcares, y otros metabolitos distintos. La glucuronidación implica la conjugación con ácido D-glucurónico. Esto se produce principalmente en el hígado, pero también se produce en otros tejidos y órganos tales como el riñón, las glándulas adrenales y el tracto alimentario. El ácido glucurónico puede ser utilizado por la *E. coli* como fuente principal de carbono y energía. La GUS proteica de *E. coli* proporciona por lo tanto de un medio por el cual la bacteria puede degradar los productos de la ruta de glucuronidación en el tracto alimentario de los vertebrados para dar lugar a ácido glucurónico como una fuente de carbono y energía. Las agliconas que también se liberan por la enzima GUS no son degradadas en general por la bacteria, sino que se utiliza como una lanzadera para el ácido D-glucurónico (Gilissen y col., Transgenic Research, 7: 157-163, 1998).

El uso del gen de la β -glucuronidasa de *E. coli* como indicador se describió por primera vez por Jefferson y col. (Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 8447-8451, 1986) y se ha utilizado sobre todo de la misma manera que se describió desde su introducción. El gen de GUS se utiliza para monitorizar la expresión genética de plantas y se emplea frecuentemente para caracterizar promotores u otros elementos de expresión. Sin embargo, algunos promotores vegetales se expresan a niveles muy bajos y pueden ser indetectables utilizando el ensayo basado en GUS. Estos promotores de expresión más baja pueden ser valiosos para el desarrollo de cultivos transgénicos con fenotipos deseables tales como un rendimiento mejorado.

Al principio del desarrollo de plantas de cultivo transgénicas, los promotores que proporcionaban la expresión constitutiva más alta eran los más deseados. Estos promotores constitutivos altos, derivados de genomas de virus de plantas tales como el virus del mosaico de la coliflor y el virus del mosaico de la escrofularia, se utilizaron para dirigir los transgenes que transmitían tolerancia a herbicidas o resistencia a insectos. Según aumenta de complejidad el campo de biotecnología vegetal, se han desarrollado nuevos rasgos transgénicos que necesitan patrones de expresión más específicos, o menores niveles de expresión. La sobre expresión o expresión en tejidos vegetales erróneos puede dar lugar a efectos no deseados en la planta transformada. Por ejemplo, la expresión ectópica (expresión de un gen en un lugar anormal en un organismo) de genes enzimáticos en plantas puede dar como resultado la reducción del producto final deseado debido al acortamiento del precursor en un punto de ramificación de una ruta metabólica (Iwase y col., Plant Biotech. 26: 29-38, 2009).

Debido a que los factores de transcripción (TF) actúan naturalmente como reguladores maestros de los procesos celulares, se espera que sean candidatos excelentes para la modificación de rasgos complejos en plantas de cultivo, y las tecnologías basadas en TF son probablemente una parte prominente de la nueva generación de cultivos biotecnológicos satisfactorios. Las tecnologías TF a menudo necesitan una optimización, bien para reducir efectos secundarios indeseados tales como retraso del crecimiento o para aumentar el rasgo deseado hasta el nivel que tenga un valor comercial. La optimización se consigue frecuentemente modificando la expresión del transgén TF. Los

promotores específicos de tejido, del desarrollo, o inducibles, más que los promotores constitutivos habituales, se pueden utilizar para limitar la expresión del transgén a los tejidos o las condiciones ambientales apropiados (Century y col., *Plant Physiology*, 147: 20-29, 2008).

Debido en parte a estos desarrollos, existe la necesidad de un ensayo más sensible para la caracterización de elementos de expresión para identificar los elementos de expresión que proporcionan un nivel y un patrón de expresión deseados. La presente invención proporciona una secuencia codificante de GUS, mejorada con el codón rediseñado que, cuando se une operativamente a un promotor, se expresa mejor que la secuencia codificante de GUS de *E. coli* que se utiliza comúnmente en la técnica. La secuencia codificante de GUS con el codón rediseñado se puede utilizar para proporcionar una mayor sensibilidad del ensayo, tanto cuantitativa como cualitativamente, y permite la caracterización de promotores y otros elementos de expresión que puede no ser posible de otra manera con la secuencia codificante de GUS nativa de *E. coli*. La secuencia codificante de Gus mejorada con el codón rediseñado se puede utilizar para caracterizar elementos de expresión en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Las plantas monocotiledóneas útiles en la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a Maíz (*Zea mays*), Arroz (*Oryza sativa*), Trigo (*Triticum*), Cebada (*Hordeum vulgare*), Sorgo (*Sorghum spp.*), Mijo, Mijo perla (*Pennisetum glaucum*), Mijo de dedo (*Eleusine coracana*), Mijo común (*Panicum miliaceum*), Moha itálica (*Setaria itálica*), Avena (*Avena sativa*), Triticale, Centeno (*Secale cereale*), Poáceas (*Digitaria*), Cebollas (*Allium spp.*), Piña (*Ananas spp.*), Césped, Caña de azúcar (*Saccharum spp.*), Palma (*Arecaceae*), Bambú (*Bambuseae*), Banana (*Musaceae*), familia de Gengibres (*Zingiberaceae*), Lirios (*Lilium*), Narcisos (*Narcissus*), Iris (*Iris*), Amarilis, Orquídeas (*Orchidaceae*), Cañas, Jacintos (*Hyacinthoides*), y Tulipanes (*Tulipa*). Las plantas dicotiledóneas útiles en la práctica de la invención, incluyen, pero no se limitan a, Soja (*Glycine max*), Soja silvestre (*Glycine soja*), Algodón (*Gossypium*), Tomate (*Solanum lycopersicum*), Pimienta (*Piper*), Calabacín (*Cucurbita*), Guisante (*Pisum sativum*), Alfalfa (*Medicago sativa*), Medicago truncatula, Alubias (*Phaseolus*), Garbanzo (*Cicer arietinum*), Girasol (*Helianthus annuus*), Patata (*Solanum tuberosum*), Maní (*Arachis hipogea*), Quinoa, trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), Algarrobo (*Ceratonia siliqua*), Remolacha (*Beta vulgaris*), Espinaca (*Spinacia oleracea*), y Pepino (*Cucumis sativus*).

25 Transformación celular

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

El término "transformación" se refiere a la introducción de una molécula de ADN en un huésped receptor. Como se utiliza en el presente documento, el término "huésped" se refiere bacterias, hongos o plantas, incluyendo cualquiera de las células, tejidos, órganos, o progenie de las bacterias, hongos o plantas. 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 ADN ajena tal como una construcción. La molécula de ADN introducida puede integrarse en el ADN genómico de la célula, tejido, órgano u organismo receptor de manera que la molécula de ADN introducida es heredada por la progenie siguiente. Una célula u organismo "transgénicos" o "transformados" también puede incluir la progenie de la célula u organismo y la progenie producida por un programa de cruzamiento que emplee dicho organismo transgénico como parental en un cruzamiento y presente un fenotipo alterado que sea el resultado de la presencia de una molécula de ADN ajena. La molécula de ADN introducida puede introducirse transitoriamente en la célula receptora de manera que la molécula de ADN introducida no se hereda por la progenie siguiente. El término "transgénico" se refiere a una bacteria, hongo o planta que contienen una o más moléculas de ADN heterólogo.

Hay muchos procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para la introducción de moléculas de ADN en células vegetales. El procedimiento comprende en general las etapas de selección de una célula huésped adecuada, la transformación de la célula huésped con un vector, y la obtención de una célula huésped transformada. Los procedimientos y materiales para la transformación de células vegetales mediante la introducción de una construcción en el genoma de una planta en la práctica de la presente invención pueden incluir cualquiera de los procedimientos bien conocidos y demostrados. Los procedimientos adecuados incluyen, pero no se limitan a, infección bacteriana (por ejemplo, con, *Agrobacterium*), vectores BAC binarios, el suministro directo de ADN (por ejemplo, mediante transformación mediada por PEG, captación de ADN mediada por desecación/inhibición, electroporación, agitado con fibras de carburo de silicio, y aceleración de partículas revestidas con ADN), entre otros.

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

Se puede regenerar posteriormente una planta transgénica a partir de la célula vegetal transgénica de la invención. Utilizando técnicas de cruzamiento convencionales o auto-polinización, se pueden producir semillas a partir de esta planta transgénica. Dicha semilla, y la planta de la progenie resultante que crece a partir de dicha semilla, contendrán la molécula de ADN recombinante de la invención, y, por lo tanto, serán transgénicas.

Las plantas transgénicas de la invención pueden auto-polinizarse para proporcionar semillas de plantas transgénicas homocigotas de la invención (homocigota para la molécula de ADN recombinante) o cruzarse con plantas no transgénicas u otras plantas transgénicas diferentes para proporcionar semillas de plantas transgénicas heterocigotas de la invención (heterocigotas para la molécula de ADN recombinante). Se hace referencia en el presente documento a ambas de dichas plantas homocigotas y heterocigotas como "plantas transgénicas". Las plantas de la progenie son plantas transgénicas descendientes de la planta transgénica original que contiene la molécula de ADN recombinante de la invención. Las semillas producidas utilizando una planta transgénica de la invención se pueden recolectar y utilizar para cultivar generaciones de plantas transgénicas, es decir, la progenie de plantas de la invención, que comprenden la construcción de la presente invención y que expresan un gen de interés agronómico. Las descripciones de los procedimientos de cruzamiento que se utilizan comúnmente para los diferentes 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); Sneep 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).

Las plantas transformadas se pueden analizar en cuanto a la presencia del gen o genes de interés y el nivel de expresión y/o perfil transmitido por los elementos reguladores de la invención. 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, pero no se limitan a, las transferencias de Southern o transferencias de Northern, estrategias basadas en PCR, análisis bioquímicos, procedimientos de exploración fenotípica, evaluaciones de campo, y ensayos inmunodiagnósticos. La expresión de una molécula de ADN 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.

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

La invención puede entenderse más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos. 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.

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación y clonación de elementos reguladores

Se identificaron nuevos promotores RCc3 y líderes y se clonaron a partir del ADN genómico de las especies de monocotiledónea lágrimas de Job (*Coix lacryma jobi*) grama sanguina (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.), Eulalia (*Miscanthus sinensis* f. *gracillimus*), maicillo oriental (*Tripsacum dactyloides*) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). La proteína RCc3 pertenece a la superfamilia de prolaminas, que deriva su nombre de las proteínas de almacenamiento ricas en prolina soluble en alcohol y glutamina de los cereales. La superfamilia de las prolaminas (también llamada familia de albúmina 2S de almacenamiento en semillas/proteína de transferencia de lípidos/inhibidora de proteasas; Pfam ID: PF00234) representa una de las superfamilias proteicas más ampliamente dispersas en el genoma vegetal. Los miembros de la superfamilia de las prolaminas son abundantes en los frutos, frutos secos, semillas, y vegetales de una variedad de plantas. Se sabe que presentan funciones diversas incluyendo el almacenamiento y protección de semillas, unión o transferencia de lípidos, e inhibición enzimática. Las proteínas de transferencia de lípidos (LTP) pertenecen a la superfamilia de las prolaminas y se expresan en una variedad de tejidos vegetales. La proteína RCc3 del arroz es una LTP que se expresa en las raíces del arroz, aunque no todas las LTP son específicas de la raíz.

Se diseñaron cebadores de amplificación de ADN (que se presentan como las SEQ ID NO: 25-28) utilizando las secuencias codificantes de veinticuatro (24) proteínas LTP de *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* y *Brachypodium distachyon*. Los cebadores de amplificación se utilizaron con bibliotecas 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.

Se llevó a cabo un análisis bioinformático para identificar elementos reguladores dentro del ADN amplificado. Utilizando los resultados de este análisis, se definieron los elementos reguladores dentro de las secuencias de ADN y los cebadores se diseñaron para amplificar los elementos reguladores. La molécula de ADN correspondiente de cada

elemento regulador se amplificó utilizando las condiciones convencionales de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que contenían sitios de enzimas de restricción únicos y el ADN genómico aislado de *C. lacryma-jobi*, *D. sanguinalis* (L.) Scop., *M. sinensis f. gracillimus*, *T. dactyloides*, y *S. officinarum*. Los fragmentos de ADN resultantes se ligaron en vectores y se secuenciaron.

- 5 Las secuencias de ADN de los promotores y líderes RCc3 identificadas se enumeran en la Tabla 1. Las secuencias de promotor se proporcionan en el presente documento como SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. Las secuencias líder se proporcionan en el presente documento como SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20.

Tabla 1. Promotores y líderes RCc3 aislados de distintas especies herbáceas.

Descripción de la secuencia	SEQ ID NO:	Género/especie
P-CI.RCc3:3	1	<i>Coix lacryma-jobi</i>
L-CI.RCc3:2	2	<i>Coix lacryma-jobi</i>
P-Ds.RCc3_1:1	3	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_1:1	4	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
P-Ds.RCc3_2:1	5	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_2:1	6	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
P-Ds.RCc3_3:1	7	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_3:1	8	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
P-MISgr.RCc3_1:1	9	<i>Miscanthus sinensis f. gracillimus</i>
L-MISgr.RCc3_1:1	10	<i>Miscanthus sinensis f. gracillimus</i>
P-MISgr.RCc3-2:2	11	<i>Miscanthus sinensis f. gracillimus</i>
L-MISgr.RCc3-2:1	12	<i>Miscanthus sinensis f. gracillimus</i>
P-Td.RCc3_1:1	13	<i>Tripsacum dactyloides</i>
L-Td.RCc3_1:1	14	<i>Tripsacum dactyloides</i>
P-Td.RCc3_2:1	15	<i>Tripsacum dactyloides</i>
L-Td.RCc3_2:1	16	<i>Tripsacum dactyloides</i>
P-Td.RCc3_3:1	17	<i>Tripsacum dactyloides</i>
L-Td.RCc3_3:1	18	<i>Tripsacum dactyloides</i>
P-So.RCc3:2	19	<i>Saccharum officinarum</i>
L-So.RCc3:2	20	<i>Saccharum officinarum</i>

10 Ejemplo 2

Análisis de elementos reguladores que dirigen la GUS en el maíz transgénico

Se transformaron las plantas de maíz con vectores, específicamente construcciones plasmídicas binarias, que comprenden un promotor RCc3 unido operativamente a su líder RCc3 nativo que dirigen la expresión del transgén de la β -glucuronidasa (GUS). Las plantas transformadas resultantes se analizaron en cuanto a la expresión de proteína GUS.

15 Los vectores utilizados en estos experimentos se construyeron utilizando procedimientos de clonación conocidos en la técnica. Los vectores resultantes comprendían una región limítrofe derecha de *A. tumefaciens*; un primer casete de expresión transgénico para ensayar la secuencia de promotor/líder RCc3 unida operativamente a una secuencia codificante con el codón rediseñado para GUS que poseía un intrón procesable GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:3 (SEQ ID NO: 29) unido operativamente en 5' a la UTR 3' del gen de S-adenosil-metionina sintetasa del mijo cola de zorro (T-SETitAms1-1:1:1, SEQ ID NO: 159); un segundo casete transgénico de selección que se utilizó para la selección de las células vegetales transformadas que transmite la resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el promotor de Actina 1 del arroz); y una región limítrofe izquierda de *A. tumefaciens*. Los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar las plantas de maíz utilizando procedimientos conocidos en la técnica. La expresión de GUS transmitida por los nuevos promotores y líderes RCc3 se comparó con la expresión dirigida por el mijo cola de zorro y los promotores y líderes homólogos de RCc3 del arroz. La Tabla 2 proporciona las construcciones plasmídicas, las secuencias de promotor y líder RCc3, y la SEQ ID NO.

Tabla 2. Plásmidos binarios de transformación de plantas y secuencias de promotor/líder RCc3 asociadas.

Construcción plasmídica	Descripción de la secuencia promotora	SEQ ID NO:	Descripción de la secuencia líder	SEQ ID NO:
pMON264146	P-CI.RCc3:3	1	L-CI.RCc3:2	2
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1	3	L-Ds.RCc3_1:1	4
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1	5	L-Ds.RCc3_2:1	6
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1	7	L-Ds.RCc3_3:1	8

pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1	9	L-MISgr.RCc3_1:1	10
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2	11	L-MISgr.RCc3-2:1	12
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1	13	L-Td.RCc3_1:1	14
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1	15	L-Td.RCc3_2:1	16
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1	17	L-Td.RCc3_3:1	18
pMON264166	P-So.RCc3:2	19	L-So.RCc3:2	20
pMON264108	P-SETit.Rcc3-1:1:10	21	L-SETit.Rcc3-1:1:2	22
pMON264206	P-Os.Rcc3-1:1:24	23	L-Os.Rcc3-1:1:2	24

En ciertos casos, las plantas se transformaron utilizando procedimientos de transformación mediados por *Agrobacterium* conocidos en la técnica y como se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2009/0138985.

- 5 Se utilizó el análisis histoquímico de GUS para el análisis de la expresión cualitativa de las plantas transformadas. Se incubaron secciones de tejido completo con solución de tinción de GUS, X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucuronido) (1 mg/ml) durante una cantidad de tiempo apropiada, se aclararon, y se inspeccionaron visualmente en cuanto a su coloración azul. La actividad de GUS se determinó cualitativamente mediante inspección visual directa o inspección bajo un microscopio utilizando órganos y tejidos seleccionados de la planta. Se inspeccionaron las plantas R₀ en cuanto a la expresión en las raíces y hozas, así como en las anteras, sedas, y semillas en desarrollo y en embriones 21 días después de la polinización (21 DAP).

15 Para el análisis cuantitativo, se extrajo el total de proteínas de los tejidos seleccionados de las plantas de maíz transformadas. Un microgramo de proteína total se utilizó con el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido (MUG) en un volumen total de reacción de 50 microlitros. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), es máximamente fluorescente a pH alto, cuando se ioniza el grupo hidroxilo. La adición de una solución básica de carbonato sódico para simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para la cuantificación del producto fluorescente. 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 anchura de hendidura fijada en 2 nm en excitación, 3 nm en emisión. Los valores de expresión media se proporcionaron como pmol de 4-MU/ μ g de proteína/hora.

- 20 La expresión de GUS media de la R₀ que se observaba para cada transformación se registró y se determinó una media del nivel de expresión y el error estándar basándose en las mediciones tomadas de las muestras derivadas de múltiples eventos de transformación.

Ejemplo 3

Amplificadores derivados de los elementos reguladores

- 25 Los amplificadores se pueden derivar a partir de los elementos promotores proporcionados en el presente documento, tal como los que se presentan como las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. Estos elementos amplificadores pueden estar comprendidos por uno o más elementos reguladores *cis* que, cuando se unen operativamente en 5' o 3' a un elemento promotor o se unen operativamente en 5' o 3' a elementos amplificadores adicionales que estén unidos operativamente a un promotor, pueden aumentar o modular la expresión de una molécula de ADN que se puede transcribir, o que proporciona la expresión de una molécula de ADN que se puede transcribir en un tipo celular u órgano vegetales específicos, o en un momento particular del desarrollo o del ritmo circadiano. Los amplificadores se producen retirando la caja TATA o elementos funcionalmente similares y cualquier secuencia de ADN corriente abajo desde los promotores que permiten que se inicie la transcripción a partir de los promotores proporcionados en el presente documento como se ha descrito anteriormente, incluyendo los fragmentos de los mismos, en los que se ha retirado la caja TATA o elementos funcionalmente similares y la secuencia de ADN corriente abajo de la caja TATA.

Los elementos amplificadores se pueden derivar de los elementos promotores proporcionados en el presente documento y se clonan utilizando procedimientos conocidos en la técnica para unirse operativamente en 5' o 3' a un elemento promotor o se une operativamente en 5' o 3' a elementos amplificadores adicionales que estén unidos operativamente a un promotor. Los elementos amplificadores se pueden clonar para unirse operativamente en 5' o 3' a un elemento promotor derivado de un organismo de género diferente o unirse operativamente en 5' o 3' a elementos amplificadores adicionales derivados de organismos de otros géneros o de un organismo del mismo género que estén unidos operativamente a un promotor derivado de un organismo del mismo o diferente género, dando como resultado un elemento regulador quimérico. Un vector de expresión de GUS se puede construir utilizando procedimientos conocidos en la técnica de manera similar a las construcciones descritas en los Ejemplos previos en los que los vectores de expresión en plantas contienen una región limitrofe derecha de *A. tumefaciens*; un primer casete transgénico para ensayar el elemento regulador o regulador quimérico comprendido por un elemento regulador o regulador quimérico unido operativamente a un intrón derivado de la proteína HSP70 de choque térmico de *Z. mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 38) o cualquiera de los intrones presentados en el presente documento o cualquier otro intrón, unido operativamente a una secuencia codificante de GUS que posea un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 32) o sin intrón (CR-Ec.uidA-1:1:4 (GUS.nat), SEQ ID NO: 31) unido operativamente a la UTR 3' de la Nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 39) o la UTR 3' del gen de la proteína de transferencia

lipídica del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 40); un segundo casete transgénico de selección que se utiliza para la selección de las células vegetales transformadas que transmite la resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el promotor de Actina 1 del arroz), o de manera alternativa, el antibiótico kanamicina (dirigido por el promotor de Actina 1 del arroz); y una región limítrofe izquierda de *A. tumefaciens*. Los plásmidos resultantes se pueden utilizar para transformar plantas de maíz o plantas de otros géneros mediante procedimientos descritos anteriormente o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica. De manera alternativa, las células de protoplasto derivadas del maíz o plantas de otros géneros se pueden transformar utilizando procedimientos conocidos en la técnica para llevar a cabo ensayos transitorios.

La expresión de GUS dirigida por elementos reguladores que comprenden uno o más amplificadores se puede evaluar en ensayos de plantas estables o transitorias para determinar los efectos del elemento amplificador sobre la expresión de un transgén. Las modificaciones de uno o más elementos amplificadores o la duplicación de uno o más elementos amplificadores se puede llevar a cabo basándose en la experimentación empírica y la regulación de la expresión genética resultante que se observa utilizando cada composición de elemento regulador. Al alterar las posiciones relativas de uno o más amplificadores del elemento regulador o regulador quimérico resultante se puede afectar la actividad transcripcional o la especificidad del elemento regulador o regulador quimérico y se determina empíricamente para identificar los mejores amplificadores para el perfil de expresión transgénica deseado dentro de la planta de maíz o planta de otro género.

Ejemplo 4

Mayor sensibilidad del ensayo con un codón rediseñado de la β -glucuronidasa (GUS)

Los promotores vegetales se expresan a menudo a niveles que están por debajo del umbral de detección normal de muchos ensayos cuantitativos, aunque sus características de expresión sean altamente valiosas para la expresión de ciertos genes. En la biotecnología vegetal anterior, los promotores que dirigían la alta expresión constitutiva eran deseables y se utilizaban para dirigir moléculas de ADN que se puede transcribir que producían un fenotipo específico que necesita una alta expresión constitutiva, tal como la tolerancia a herbicidas o la resistencia a insectos. Estos altos promotores constitutivos a menudo se derivan de los genomas de virus de las plantas más que de los genomas de las plantas, por ejemplo, los promotores 35S derivados del virus del mosaico de la coliflor y el virus del mosaico de la escrofularia. Extraordinariamente, en ciertos casos, la alta expresión constitutiva de ciertas moléculas de ADN que se pueden transcribir puede dar lugar a consecuencias negativas tales como el silenciamiento genético, bloqueo de fenotipos, o resistencia al rendimiento. Por ejemplo, la alta expresión del gen GUS en plantas transgénicas de caña de azúcar utilizando dos promotores ubiquitina derivados de caña de azúcar, así como un promotor ubiquitina del maíz resultaba en un silenciamiento genético post transcripcional del gen de GUS (Wei y col., J. Plant Physiol. 160: 1241-1251, 2003).

Adicionalmente, actualmente existe una demanda de promotores que demuestren patrones específicos de expresión o se expresen en tejidos específicos de la planta más altamente. Por ejemplo, la expresión ectópica de genes enzimáticos en plantas puede dar como resultado la reducción del producto final deseado debido a un acortamiento del precursor en un punto de ramificación de una ruta metabólica (Iwase y col., Plant Biotech. 26:29-38, 2009). En estos casos, es deseable utilizar un promotor que exprese la molécula de ADN que se puede transcribir a la que se une operativamente en el tipo tisular o celular correctos, o en una ventana particular de desarrollo. Los promotores derivados del genoma vegetal pueden demostrar características de expresión deseables en el tejido, célula o desarrollo. Debido a los niveles de expresión de estos promotores vegetales, los ensayos de expresión a menudo necesitan amplificadores para reforzar el nivel de expresión para permitir la detección en un ensayo cuantitativo. Sin embargo, el uso de dichos amplificadores a menudo cambia el patrón total de expresión del promotor vegetal.

La mejora de la expresión del gen indicador que se utiliza en el ensayo elimina la necesidad de aumentar el promotor derivado de una planta y, por lo tanto, proporciona una evaluación más precisa del patrón de expresión transmitido por un promotor. Este Ejemplo muestra el uso de una secuencia codificante de GUS con el codón rediseñado para mejorar la sensibilidad del ensayo cuantitativo en la caracterización de varios EXP diferentes comprendidos por una secuencia promotora, unida operativamente en 5' a una secuencia líder, unida operativamente en 5' a una secuencia de intrón.

Se transformaron plantas de maíz con vectores de expresión en plantas que contenían las secuencias EXP que dirigen la expresión del transgén de β -glucuronidasa (GUS) nativa de *Escherichia coli* o el transgén de la β -glucuronidasa (GUS.nno) con el codón rediseñado, y las plantas resultantes se analizaron en cuanto a la expresión proteica de GUS. Las secuencias codificantes de GUS y los EXP se clonaron en construcciones plasmídicas binarias utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

Las construcciones de expresión en plantas resultantes contienen una región limítrofe derecha de *A. tumefaciens*; un primer casete transgénico que muestra la sensibilidad del ensayo de las dos secuencias codificantes de GUS, comprendidas por un EXP unido operativamente a la secuencia codificante de GUS nativa de *E. coli* (CR-Ec.uidA-1:1:4 (GUS.nat), SEQ ID NO: 31) o una secuencia codificante de GUS de *E. coli* con el codón rediseñado (CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 (GUS.nno), SEQ ID NO: 30) unida operativamente en 5' a la UTR 3' del gen de la proteína de transferencia lipídica del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 40); un segundo casete transgénico de selección que se

utilizó para la selección de las células vegetales transformadas que transmite la resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el promotor de Actina 1 del arroz); y una región limítrofe izquierda de *A. tumefaciens*. Las FIG. 1a a 1c muestran un alineamiento entre la secuencia codificante de GUS nativa (CR-Ec.uidA-1:1:4) y la secuencia codificante de GUS con el codón rediseñado (CR-Ec.uidA_nno-1:1:1). Los nucleótidos idénticos en el alineamiento se indican mediante un asterisco. La secuencia de GUS con el codón rediseñado es un 77,9 % idéntica a la secuencia codificante de la GUS nativa y se ha diseñado para expresarse mejor en plantas.

Se utilizaron tres (3) clases diferentes de EXP, que transmitía cada una un patrón de expresión específico. Los EXP: EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 34) y EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:2 (SEQ ID NO: 35) transmite un perfil de expresión en hojas del maíz y son esencialmente idénticas con la excepción de una inserción de cinco nucleótidos de 5'-CCGA-3' en las posiciones de nucleótidos 1408 a 1412 de EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:2. La secuencia de EXP: EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5 (SEQ ID NO: 36) proporciona un perfil de expresión en raíces aumentado en el maíz. La secuencia del EXP: EXP-Zm.UbqM1:1:2 (SEQ ID NO: 37) proporciona un alto perfil de expresión constitutiva en el maíz. Los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar plantas de maíz utilizando procedimientos conocidos en la técnica. La Tabla 3 enumera las denominaciones de las construcciones plasmídicas, y las secuencias de EXP y GUS correspondientes.

Tabla 3. Construcciones plasmídicas, secuencias EXP y patrones de expresión utilizados para comparar las secuencias codificantes de GUS nativa vs. GUS con el codón rediseñado.

Construcción plasmídica	Descripción del EXP	Patrón de expresión	SEQ ID NO:	GUS	SEQ ID NO:
pMON122599	EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:2	Hojas	35	CR-Ec.uidA-1:1:4	31
pMON122595	EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:1	Hojas	34	CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	30
pMON144050	EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5	Raíces aumentadas	36	CR-Ec.uidA-1:1:4	31
pMON122597	EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5	Raíces aumentadas	36	CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	30
pMON144051	EXP-Zm.UbqM1:1:2	Constitutivo	37	CR-Ec.uidA-1:1:4	31
pMON122598	EXP-Zm.UbqM1:1:2	Constitutivo	37	CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	30

En ciertos casos, las plantas se transformaron utilizando procedimientos de transformación mediados por *Agrobacterium* conocidos en la técnica y como se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2009/0138985.

Se utilizó el análisis histoquímico de GUS para el análisis de la expresión cualitativa de las plantas transformadas. Se incubaron secciones de tejido completo con solución de tinción de GUS X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucuronido) (1 mg/ml) durante una longitud de tiempo apropiada, se aclararon, y se inspeccionaron visualmente para ver la coloración azul. La actividad de GUS se determinó cualitativamente mediante inspección visual directa o inspección bajo un microscopio utilizando órganos y tejidos seleccionados de la planta. Se inspeccionaron las plantas R0 en cuanto a la expresión en las raíces y hojas, así como en las anteras, sedas, y semillas en desarrollo y en embriones 21 días después de la polinización (21 DAP).

Para el análisis cuantitativo, se extrajo el total de proteínas de los tejidos seleccionados de las plantas de maíz transformadas. Un microgramo de proteína total se utilizó con el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido (MUG) en un volumen total de reacción de 50 μ l. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), es máximamente fluorescente a pH alto, cuando se ioniza el grupo hidroxilo. La adición de una solución básica de carbonato sódico para simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para la cuantificación del producto fluorescente. 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 anchura de hendidura fijada en 2 nm en excitación, 3 nm en emisión.

Los valores de expresión de GUS medios para los transformantes de la generación R₀ se proporcionan en las Tablas 4, 5 y 6.

Tabla 4. Media de la expresión de GUS en la generación R₀ de una secuencia codificante de GUS nativa y con el codón rediseñado utilizando un EXP con un perfil de expresión en hojas.

Tejido	pMON122599 EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:2/CR-Ec.uidA-1:1:4	pMON122595 EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:1/CR-Ec.uidA_nno-1:1:1
Hojas en V4	798	1807
Hojas en V7	230	1863

Hojas en VT	508	2097
Raíces en V4	0	0
Raíces en V7	0	0
Raíces en VT	14	0
Antera	95	1056
Sedas	154	1590
Embrión de 21DAP	24	31
Endospermo de 21DAP	18	61

Tabla 5. Media de la expresión de GUS en la generación R₀ de una secuencia codificante de GUS nativa y con el codón rediseñado utilizando un EXP con un perfil aumentado de expresión en raíces.

Tejido	pMON144050 EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5/CR-Ec.uidA-1:1:4	pMON122597 EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5/CR-Ec.uidA_nno-1:1:1
Hojas en V4	0	50
Hojas en V7	0	51
Hojas en VT	0	82
Raíces en V4	26	486
Raíces en V7	16	257
Raíces en VT	18	343
Antera	19	67
Sedas	0	12
Embrión de 21DAP	14	125
Endospermo de 21DAP	17	45

5 Tabla 6. Media de la expresión de GUS en la generación R₀ de una secuencia codificante de GUS nativa y con el codón rediseñado utilizando un EXP con un perfil de expresión constitutivo.

Tejido	pMON144051 EXP-Zm.UbqM1:1:2/CR-Ec.uidA-1:1:4	pMON122598 EXP-Zm.UbqM1:1:2/CR-Ec.uidA_nno-1:1:1
Hojas en V4	988	3327
Hojas en V7	963	2771
Hojas en VT	1777	3787
Raíces en V4	693	2149
Raíces en V7	402	1443
Raíces en VT	776	3170
Antera	2247	3190
Sedas	975	3324
Embrión de 21DAP	511	894
Endospermo de 21DAP	791	2298

10 Como se puede ver en las tablas 4 a 6, existe una mayor sensibilidad en los ensayos cuantitativos utilizando la secuencia codificante de GUS con el codón rediseñado cuando se compara con la secuencia codificante de GUS nativa. Se espera alguna variabilidad entre las poblaciones GUS.nno y GUS.nat, ya que la expresión puede estar afectada por los sitios de inserción del T-ADN; sin embargo, la tendencia general en la sensibilidad muestra una sensibilidad mucho mayor utilizando GUS.nno. La GUS dirigida por EXP: EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 34) y EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:2 (SEQ ID NO: 35) mostraban una sensibilidad de 2,26 a 8,1 veces mayor utilizando GUS.nno cuando se comparaba con GUS.nat. De la misma manera, el perfil aumentado en raíces proporcionado por EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5 (SEQ ID NO: 36) era 16,06 a 19,06 veces mayor utilizando GUS.nno que GUS.nat, haciendo que esta secuencia codificante de GUS con el codón rediseñado ideal para la exploración de promotores de raíces, especialmente los promotores que se expresan a niveles bajos, y puede mostrar valores de GUS en o por debajo de niveles de fondo cuando se utiliza la secuencia codificante de GUS nativa. El alto perfil de expresión constitutiva transmitido por EXP-Zm.UbqM1:1:2 (SEQ ID NO: 37) mostraba una sensibilidad cuantitativa 1,42 a 4,09 veces mayor cuando se utilizaba GUS.nno en comparación con GUS.nat.

15 Cualitativamente, la tinción de GUS era más sensible y se observaba constantemente en muestras de tejido utilizando la secuencia codificante de GUS con el codón rediseñado. En general, las observaciones de tinción cualitativas tendían a ser menos sensibles que los ensayos cuantitativos. El uso de una secuencia codificante de GUS con el codón rediseñado proporciona inspecciones mejores y más constantes de los tejidos teñidos. Por ejemplo, en los tejidos radicales, cuando se dirigía la GUS mediante el EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5 (SEQ ID NO: 36), la

tinción histoquímica de los tejidos transformados con la secuencia codificante de GUS con el codón rediseñado era más pronunciada y visible en las muestras de raíces V7 de la corteza, epidermis, endodermis, pelos radicales y puntas radicales secundarias. Por el contrario, la tinción de GUS no se observaba cualitativamente en los tejidos radicales V7 correspondientes cuando la secuencia codificante de GUS era dirigida por el EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5. La secuencia codificante de GUS mejorada con el codón rediseñado, (CR-Ec.uid_anno-1:1:1, SEQ ID NO: 30), proporcionaba mayor sensibilidad del ensayo y era particularmente valioso en la medición de la expresión de promotores que se expresan a niveles bajos.

Ejemplo 5

Análisis de los elementos reguladores que dirigen la GUS en protoplastos de hojas y raíces del maíz

Se transformaron protoplastos de hojas y raíces de maíz con vectores que comprendían un promotor RCc3 unido operativamente a su líder RCc3 nativo que dirigen la expresión del transgén de β -glucuronidasa (GUS), y los protoplastos transformados resultantes se analizaron en cuanto a la expresión de la GUS proteica. Las secuencias del promotor y el líder RCc3 se clonaron en construcciones plasmídicas binarias utilizando procedimientos conocidos en la técnica y como se ha descrito previamente en el Ejemplo 2.

También se construyeron dos construcciones plasmídicas para su uso en la co-transformación y normalización de los datos, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Cada una de estas construcciones plasmídicas contenía una secuencia codificante de luciferasa que estaba dirigida por un EXP constitutivo. El vector pMON19437 comprendía un casete de expresión con un promotor constitutivo unido operativamente en 5' a un intrón, (EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1, SEQ ID NO: 41), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) (LUCIFERASE:1:3, SEQ ID NO: 42), unida operativamente en 5' a una UTR 3' del gen de nopalina sintasa del *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 39). El vector pMON63934 comprendía un casete de expresión con una secuencia de un EXP constitutivo (EXP-CaMV.35S-enh-Lhcbl, SEQ ID NO: 44), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de luciferasa de pensamiento de mar (*Renilla reniformis*) (CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1, SEQ ID NO: 43), unida operativamente en 5' a una UTR 3' del gen de nopalina sintasa del *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 39).

Los protoplastos de hojas y raíces de maíz se transformaron utilizando un procedimiento de transformación basado en polietilenglicol (PEG), que se conoce bien en la técnica. Las células protoplásticas se transformaron con el pMON19437, pMON63934, y uno de los plásmidos presentados en la Tabla 7. Después de la transformación, los protoplastos transformados se incubaron durante una noche en total oscuridad. A continuación, se llevó a cabo la medición de GUS y luciferasa colocando alícuotas de una preparación de células transformadas lisadas como se ha señalado anteriormente en dos bandejas de pocillos pequeños diferentes. Una bandeja se utilizó para las mediciones de GUS y una segunda bandeja se utilizó para llevar a cabo un ensayo dual de luciferasa utilizando el sistema de ensayo dual de indicador de luciferasa (Promega Corp., Madison, WI; véase, por ejemplo, Promega Notes Magazine, No: 57, 1996, p.02).

Se llevaron a cabo cuatro transformaciones para cada secuencia de EXP o promotor + líder + intrón. Se determinaron los valores medios de la expresión para cada secuencia de EXP o promotor + líder + intrón de varias muestras de cada transformación. Las mediciones de las muestras si hicieron utilizando cuatro repeticiones de la transformación con la construcción plasmídica con cada secuencia de EXP o promotor + líder + intrón. Se determinó el fondo de expresión GUS utilizando una construcción plasmídica de control negativo que carecía del transgén GUS. Los niveles medios de expresión de GUS y luciferasa se proporcionan en las Tablas 7 (hojas) y 8 (raíces). En estas tablas, los valores de luciferasa de luciérnaga (por ejemplo, de la expresión de pMON19437) se proporcionan en la columna marcada con "FLUC" y los valores de luciferasa de pensamiento de mar (por ejemplo, de la expresión de pMON63934) se proporcionan en la columna marcada con "RLUC". También se proporcionan en las Tablas 7 y 8 las medias de las relaciones GUS/FLUC y GUS/RLUC que proporcionan una medida relativa de la fuerza de expresión en los ensayos con protoplastos.

Tabla 7. Valores medios de GUS, FLUC y RLUC derivados de los protoplastos de hojas de maíz transformados.

Construcción plasmídica	Promotor Líder	SEQ ID NO:	Media de GUS	Media de FLUC	Media de RLUC	Media de GUS/ FLUC	Media de GUS/ RLUC
pMON264146	P-CI.RCc3:3 L-CI.RCc3:2	1 2	5328064,75	105434	253107,5	50,73	21,15
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	773613	147918	338149,5	5,23	2,28
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	2883555,75	129947,5	309268,5	22,33	9,45
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	1093785	124864,75	306178,75	8,70	3,55

ES 2 769 898 T3

pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1	9	2613839,75	128887,25	301412,75	20,45	8,83
	L-MISgr.RCc3_1:1	10					
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2	11	2370706,25	149383,5	370443,75	15,95	6,53
	L-MISgr.RCc3-2:1	12					
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1	13	7506585,75	150939,25	368035,5	50,15	20,88
	L-Td.RCc3_1:1	14					
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1	15	4447254,25	155356,25	364604,5	28,78	12,40
	L-Td.RCc3_2:1	16					
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1	17	1100118,75	153451	316691,5	7,13	3,48
	L-Td.RCc3_3:1	18					
pMON264166	P-So.RCc3:2	19	3062045	143684,5	332394,5	21,55	9,45
	L-So.RCc3:2	20					
pMON264108	P-SETit.Rcc3-1:1:10	21	147483	129834,25	300917,25	1,15	0,50
	L-SETit.Rcc3-1:1:2	22					
pMON264206	P-Os.Rcc3-1:1:24	23	184905,25	171440,75	386387,25	1,08	0,50
	L-Os.Rcc3-1:1:2	24					

Tabla 8. Valores medios de GUS, FLUC y RLUC derivados de los protoplastos de raíces de maíz transformados.

Construcción plasmídica	Promotor Líder	SEQ ID NO:	Media de GUS	Media de FLUC	Media de RLUC	Media de GUS/ FLUC	Media de GUS/ RLUC
pMON264146	P-CI.RCc3:3	1	185142,3	18310	34502,5	10,18	5,43
	L-CI.RCc3:2	2					
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1	3	16306,5	17008	31233	0,98	0,53
	L-Ds.RCc3_1:1	4					
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1	5	101603,8	19201,25	43298	5,23	2,33
	L-Ds.RCc3_2:1	6					
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1	7	29196	14483,5	34700,75	2,03	0,88
	L-Ds.RCc3_3:1	8					
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1	9	87232	18411,75	44755,75	4,80	1,95
	L-MISgr.RCc3_1:1	10					
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2	11	510761,5	19093,75	41948,5	26,98	12,30
	L-MISgr.RCc3-2:1	12					
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1	13	884517,8	23881,75	55790	37,23	16,18
	L-Td.RCc3_1:1	14					
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1	15	91634,5	18385	43509,5	5,03	2,18
	L-Td.RCc3_2:1	16					
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1	17	50257,25	18716,75	34489	2,65	1,45
	L-Td.RCc3_3:1	18					
pMON264166	P-So.RCc3:2	19	508345,3	22335,25	51655,75	22,98	10,13
	L-So.RCc3:2	20					

(continuación)

Construcción plasmídica	Promotor Líder	SEQ ID NO:	Media de GUS	Media de FLUC	Media de RLUC	Media de GUS/ FLUC	Media de GUS/ RLUC
pMON264108	P-SETit.Rcc3-1: 1:10	21	8123	17750,75	37872,25	0,45	0,23
	L-SETit.Rcc3-1: 1:2	22					
pMON264206	P-Os.Rcc3-1:1: 24	23	336095,3	17709,5	40179,5	19,65	8,63
	L-Os.Rcc3-1:1: 2	24					

5 Como se muestra en la Tabla 7 todos los promotores homólogos RCc3 presentaban la capacidad de dirigir la expresión transgénica en los protoplastos de hojas de maíz. Algunos de los homólogos del promotor RCc3 dirigían la expresión de manera más alta que otros en este ensayo basado en las relaciones de GUS/FLUC y GUS/RLUC. Adicionalmente, como se muestra en la Tabla 8 todos los homólogos del promotor RCc3 presentaban la capacidad de dirigir la expresión transgénica en los protoplastos de raíces de maíz en grados variables.

Ejemplo 6

Análisis de elementos reguladores que dirigen la GUS en el maíz transgénico.

10 Se transformaron las plantas de maíz con vectores que comprendían un promotor RCc3 unido operativamente a su líder RCc3 nativo que dirigen la expresión del transgén de la β-glucuronidasa (GUS). Las plantas transformadas resultantes se analizaron en cuanto a la expresión de proteína GUS.

15 Las secuencias del promotor y el líder RCc3 se clonaron en construcciones plasmídicas binarias utilizando procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en el Ejemplo 2. Las construcciones plasmídicas binarias resultantes eran pMON264146, pMON264148, pMON264088, pMON264107, pMON264186, pMON264187, pMON264049, pMON264050, pMON264147 y pMON264166. Las plantas de maíz también se transformaron establemente con pMON264108 y pMON264206. Se llevó a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo de expresión de GUS como se describe en el Ejemplo 2. Las plantas se ensayaron en estadios de desarrollo V4, V7 y VT. Se muestra el muestreo en R1 y R3. La tabla 9 muestra la media de expresión de GUS cuantitativa para las plantas de maíz transformadas establemente.

20

Tabla 9. Media cuantitativa de expresión de GUS en plantas de maíz transformadas establemente.

Construcción plasmídica	Promotor Líder	SEQ ID NO:	Hojas en V4	Raíces en V4	Hojas en V7	Raíces en V7	Hojas en VT	Raíces en VT	Flores/ anteras en VT	Mazorca/ sedas en R1	Embrión de 21DAP en R3	Endospermo de 21DAP en R3
pMON264146	P-CI.RCc3:3 L-CI.RCc3:2	1 2	25,15	61,31	20,71	42,64	35,96	95,19	298	125,12	21,97	186,52
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1 L- Ds.RCc3_1:1	3 4	48,34	36,81	42,49	125,25	69,76	55,44	277,93	58	67,08	115,71
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1 L- Ds.RCc3_2:1	5 6	28,31	51,18	59,2	149,2	70,93	158,32	214,47	120,72	141,85	164,68
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1 L- Ds.RCc3_3:1	7 8	67,1	327,44	85,02	365,51	161,65	202,17	787,25	103,63		
pMON264186	P- MISgr.RCc3_1: 1 L- MISgr.RCc3_1: 1	9 10	38,66	40,25	39,7	139,98	105,24	308,24	406,38	239,35	118,54	196,48
pMON264187	P- MISgr.RCc3-2:2 L- MISgr.RCc3-2:1	11 12	25,9	193,25	42,13	291,5	48,02	549,37	87,89	41,83		
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1 L- Td.RCc3_1:1	13 14	283,86	238,31								
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1 L- Td.RCc3_2:1	15 16	51,82	653,38								
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1 L- Td.RCc3_3:1	17 18	42,49	55,87	41,49	197,51	117,77	282,63	1182,96	938,3	815,36	1240,92
pMON264166	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	34,11	215,86	125,91	855,23	79,33	237,25	347,99	177,13		

Como se muestra en la Tabla 9, todos los homólogos del promotor RCc3 eran capaces de dirigir la expresión del transgén de GUS en las plantas de maíz transformadas establemente. Adicionalmente, cada promotor tenía un patrón de expresión que era único del promotor específico. Por ejemplo, la expresión en flores/anteras en VT se diferenciaba entre los homólogos del promotor RCc3. La expresión dirigida por P-Td.RCc3_3:1 (SEQ ID NO: 17) era la más alta expresión observada de todos los promotores, mientras que la expresión dirigida por P-MISgr.RCc3-2:2 (SEQ ID NO: 11) era la más baja. Con respecto a la expresión en Mazorca/sedas en R1, el P-Td.RCc3_3:1 (SEQ ID NO: 17) presentaba la expresión más alta en estos tejidos y el P-MISgr.RCc3-2:2 (SEQ ID NO: 11) era el menos expresado. La expresión dirigida por P-Td.RCc3_3:1 (SEQ ID NO: 17) aumentaba en tejidos de desarrollo más tardío. La expresión aumentaba en las raíces desde el estadio V4 a VT y era incluso mayor en las flores/anteras en VT, mazorca/sedas en R1 y embrión de 21DAP y endospermo en R3. La expresión dirigida por P-Td.RCc3_3:1 era la más alta entre los homólogos del promotor RCc3 en flores/anteras en VT, mazorca/sedas en R1, y embrión de 21DAP y endospermo en R3.

Con respecto a la expresión en hojas y raíces, algunos homólogos del promotor RCc3 presentaban una expresión más alta en la raíz con respecto a las hojas. La Tabla 10 muestra las relaciones de expresión en raíces respecto a hojas para todos los promotores RCc3 ensayados.

Tabla 10. Relaciones de expresión en raíces/hojas para las plantas de maíz transformadas establemente.

Construcción plasmídica	Promotor Líder	SEQ ID NO:	Media de Raíces/hojas		
			V4	V7	VT
pMON264146	P-CI.RCc3:3	1	2,44	2,06	2,65
	L-CI.RCc3:2	2			
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1	3	0,76	2,95	0,79
	L-Ds.RCc3_1:1	4			
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1	5	1,81	2,52	2,23
	L-Ds.RCc3_2:1	6			
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1	7	4,88	4,30	1,25
	L-Ds.RCc3_3:1	8			
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1	9	1,04	3,53	2,93
	L-MISgr.RCc3_1:1	10			
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2	11	7,46	6,92	11,44
	L-MISgr.RCc3-2:1	12			
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1	13	0,84		
	L-Td.RCc3_1:1	14			
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1	15	12,61		
	L-Td.RCc3_2:1	16			
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1	17	1,31	4,76	2,40
	L-Td.RCc3_3:1	18			
pMON264166	P-So.RCc3:2	19	6,33	6,79	2,99
	L-So.RCc3:2	20			

Como se demuestra en la Tabla 10, cada homólogo del promotor RCc3 mostraba diferentes relaciones de la expresión en raíces respecto a hojas y diferentes patrones desde el estadio V4 a VT. Por ejemplo, el P-CI.RCc3:3 (SEQ ID NO: 1) mantenía una relación similar de expresión desde V4 a VT con un ligero declive que se producía en el estadio V7. La expresión en las raíces como se ve en la Tabla 9 caía ligeramente desde V4 a V7, y luego aumentaba por el estadio VT. El promotor P-Ds.RCc3_3:1 (SEQ ID NO: 7) mostraba un cambio en las relaciones de expresión desde el estadio V4 al VT con una expresión más alta en las raíces con respecto a las hojas en el estadio V4 y V7 y luego un cambio que se aproximaba a la misma expresión en las hojas con respecto a las raíces en el estadio VT (1,25). Con este promotor la media de expresión que se muestra en la tabla 9, presentaba un aumento de la expresión en las hojas desde el estadio V4 al VT mientras que la expresión en las raíces disminuía desde el estadio V7 al VT. El promotor P-So.RCc3:2 (SEQ ID NO: 19) mantenía una relación de expresión en raíces respecto a hojas de 6,33 en el estadio V4 y 6,79 en V7, pero luego caía a 2,99 en el estadio VT. Sin embargo, la expresión con este promotor aumentaba 3,69 y 3,96 veces en las hojas y raíces respectivamente, desde el estadio V4 al V7 y luego disminuía a 2,33 y 1,10 con respecto al V4 en el estadio VT.

Extraordinariamente, no todos los promotores tenían una relación raíces respecto a hojas más alta. Por ejemplo, los promotores P-Ds.RCc3_1:1 (SEQ ID NO: 3) y P-Td.RCc3_1:1 (SEQ ID NO: 13) tenían relaciones raíces/hojas menores de uno en el estadio V4. Sin embargo, la expresión dirigida por P-Td.RCc3_1:1 era 6,6 veces mayor que la de P-Ds.RCc3_1:1 en raíces en V4. La relación más alta de raíces/hojas en el estadio V4 se alcanzaba utilizando el P-Td.RCc3_2:1 (SEQ ID NO: 15). La relación de la expresión en raíces/hojas dirigida por P-Ds.RCc3_1:1 aumentaba desde V4 (0,76) a V7 (2,95) y luego volvía a una relación similar a la de V4 (0,79).

El promotor P-MISgr.RCc3-2:2 (SEQ ID NO: 11) mostraba un aumento de expresión tanto en hojas como raíces desde

el estadio V4 al VT. Este promotor tenía una relación raíces-hojas mayor de 6,9 a lo largo de los tres estadios, pero la relación pasaba de 7,46 en el estadio V4 a 6,92 en el estadio V7 y luego ascendía a 11,44 en el estadio VT. La expresión dirigida por P-MIS-gr.RCc3-2:2 aumentaba en las hojas y raíces desde el estadio V4 al VT.

- 5 Cada uno de los promotores homólogos de RCc3 mostraban patrones de expresión en el maíz transformado establemente que no necesariamente se podían predecir por el hecho de derivarse de genes homólogos, especialmente cuando se utilizan para transformar una especie heteróloga tal como el maíz. La mayoría de los promotores mostraban una expresión más alta en las raíces con respecto a las hojas en ciertos puntos del estadio V4, V7 o VT o en todos los estadios ensayados. Extraordinariamente, la magnitud de la expresión se diferenciaba extensamente entre los promotores. Las propiedades de expresión únicas de cada homólogo del promotor RCc3 hace
- 10 a algunos más adecuados que otros para ciertos tipos de expresión de moléculas de ADN que se pueden transcribir. Por ejemplo, la expresión de una molécula de ADN que se puede transcribir puede ser crítica para la asimilación de un nutriente del suelo y la cual se expresa mejor en un estadio más tardío del desarrollo cuando la planta casi va a empezar la reproducción y la producción de semillas, puede beneficiarse mejor de un promotor tal como el P-MISgr.RCc3-2:2 (SEQ ID NO: 11) que aumenta la expresión en las raíces alrededor del estadio VT.
- 15 Habiendo ilustrado y descrito los principios de la invención, debería ser evidente para los expertos en la técnica que la invención se puede modificar en la disposición y detalles sin alejarse de dichos principios. Los inventores reivindican todas las modificaciones que están dentro del espíritu y ámbito de las reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Monsanto Technology LLC
- <120> ELEMENTOS REGULADORES EN PLANTAS Y USOS DE LOS MISMOS
- <130> MONS:331WO
- <150> 61/785.245
- 25 <151> 14-03-2013
- <160> 44
- <210> 1
- <211> 1500
- <212> ADN
- <213> *Coix lacryma-jobi*
- <400> 1

ES 2 769 898 T3

gttgacgtcg gaagtgatcc gaatcaaaca ccaacagggc tagaacgccc ggagagcgag 60
 gttgcagttc aacctgctga gacagcaggg accctggcta aaccgacgaa aaccgatcta 120
 gagaccgggt tagatcgatc tagggtttcg ggctcctgtg ttgataactc tagaactcct 180
 cccgggaaga cccgtagggg agaagcacgt agaggttgtc ctaggaccag caaggccgcc 240
 tagaacgccc tcaagtctcg tcgggagacg cgccgaacag caaggtagaa ggaaaaaggg 300
 gtaaaagggt agtagattga ttttgatcga ttagggtcgg atgcctcaat cggccatgat 360
 cctctcatat atatagaggg ggctggtctt atcccaatag gaaacatctc cggatacgat 420
 ctccaagctt cctatccgga ctctatcaac atatagaatt caatccggac gtgacaaggt 480
 aaccctgatt tcgccgatcc ttggatcgac cagatcggtc taatgggctt tatcagccca 540
 tactgatcaa caaatcgtcc ttacaagaga aggatccaca tacttagcgt cggactcagc 600
 aatcatcaca accataaggc ctccaaccag ggccacctgg tcggacataa catgagtgat 660
 cggaaaccca aatgatcag gccattcaa cttagaacat ctgatctctc aaaagacaaa 720
 ttcgacctta atattacagg ccgaatactt cttctaaatt catttttatc tgtgacactt 780
 ttgagtgtca acagtatgct tttctttgca aatattccct tttttatttc taccattag 840
 ttactttggc ccttccattt cattgtatgt aaaagtggat actaaagcta acgcaacaag 900
 aacaaaaata aatagatccg gggtatgacg tccccacgga tattttacta aatatcttc 960
 tcatcagatc tagaaaatcc tcgggcccta tccatatagg gtggtatcac atccatatac 1020
 ttatagtagg acagatgagg agattttttt accctcaatt ctaaaattca tcactttaat 1080
 taaaggaatt taactcagga ccagagcggg gtcgagagag ccatatatgt aacaaaaata 1140
 cctattagtt tagggcagca gcaaataaac cattattcct ttgtcccctt attccgtctc 1200
 cagctagcta aaagctgtac atatgattaa tcatcgacat cgtgcatgca atttgcagga 1260
 aagtgcaagg agcagccagg tgtatacacg tctgtagggg tcgcgtcaca tcgatcacat 1320
 ggatatgcat gcatccaaaa cacacgtacg tacacttgct ggtgcatgcc ttatgaaatg 1380
 gaatactaca cgcagtcca caagttaagc acgcacaggc acacacacag agagacacag 1440
 ttgctcgctc aatgcaattg gctggtctat aaataccacc gaagagaacc atcctaaaga 1500

<210> 2
 <211> 86
 <212> ADN
 <213> *Coix lacryma-jobi*

5

<400> 2

acacaccggt agcgattcga tccttcagaa gagctactgc tagctagcta gagctatcat 60
 ctgatcggta gcagcaatat aattca 86

ES 2 769 898 T3

<210> 3
 <211> 594
 <212> ADN
 <213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

5 <400> 3

accaacaagc atcatgacaa tggcagcaaa gcattcgtca gagacgacca acaagcatca 60
 cgacactggc ggcaaagcat atcaaaacaa tgtaatgaga tacaatattg tttcataaag 120
 aagcctacct gcatgatcct ttctaacaaa ctcaaaatga taagggccat gctctgttcg 180
 gtgacaacct tcaaggcatc tactttgcc a gaatttagct ttgttattac cagcttgta 240
 ttagttctta ctatccagtc tcgaacaact tgggcgccct ttgtctcatc atacctctac 300
 atactgccct ccctgatcaa cacaacattc ttcaacccaa tcccttggca tttgcgcatg 360
 ttacaagggtg caaaacagcc agccatatt gcaagttact aaactaaact atggtccaaa 420
 tgcagcaatc ttgatcgcta gtactgtccg gcattatatac tgaaacaagt ccagatcacc 480
 catctcatca cagtcacatg cattcgcggt cacggaaacc gttaacacac caccaactag 540
 tcagcattgc accaatcttc ctccctataa atgcagcaac aatcgagcga cacc 594

<210> 4
 <211> 88
 <212> ADN
 <213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

10 <400> 4

aacaccacga accatcacag gcacttatag caacaatcaa gttatttctg ccttgtgcac 60
 tcgtggtcga gtagtaatac atagcaaa 88

<210> 5
 <211> 1500
 <212> ADN
 <213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

15 <400> 5

20 <400> 5

ES 2 769 898 T3

ttgccggcct gtgtgatggt gcgccccac caacctttga ttttgccctgc tgccttgca 60
 gccaacgggt ggtagtccac cctcttcaaa cgtcgcaccg aagttctgtc gactcccaga 120
 gaaaatattg tatgtaacat atactattac tactacagct gaacacgtaa caatatgatc 180
 ttattttgtgt atgccgaaag caccgtgcta aagaccacct atcgccctgg ttgggatcga 240
 ggccttgctg ctcagccggg tgcatacagac gtgtgcgtgc atcgcatgac tggcatgtga 300
 gttgtgggtc ataaataatg tctaacaata ttaaggtaat tcctagtatg cgttgggatc 360
 attttttgat gttggatcct gcggcaggtc tcacccatgc atgacggatt gagaacaagg 420
 gagactggac cagcatgtaa aagataatga tgaaggcgag ccatggtgac ggtgtaccgg 480
 gacagggcaga cgcgggcca catcgaagag ggagatagcg tgcgtgctaa tgtttttgtg 540
 gctcgcgatgt tcaatgactc atacagattt cggtagcttg ctaaaatcat tcagcttgc 600
 ggcaagcatg ggccaaacaa tctagcaaca atccatgttt gccatcgatg caataggaag 660
 taatagaatc cacttagctt ctagatctca cctggatcct ccttttattt atatgcatat 720
 attttgtggt agtggaggca cacatcttta tgtttcatgg ataataattt gttatatgta 780
 tatctgtcca aataaataac gtacgtgtcc ttcaatctta gactccagtt agattgatca 840
 atgtagtggg cttccatatt ccttttgtgt tttgtgtgcc atgtctcaag catgcatgtg 900
 gaatgaaaag ctggaagctt ggcatacaatt gcctaaggag ccataccata aattaaacca 960
 tttgctgata tggccacaat ttttttaaca agctatgcca tagtcattca tgtgccacgg 1020
 ttgttgaatc gcctcaatta cgtgtggaac atgatgggtg tttaaacaac acttgggtgat 1080
 ttctattctg gcctactctt gcatctagga tcgtgttggt agccatgtgc acatatttag 1140
 ctagctagta gcaaaggcat gagtgagttg ctgatgggtt tacaataacc agcataagta 1200
 ttcattaatt tgaagtgaag cacgttcatg aacatatgag aaaacttaca ttataatttg 1260
 cttggtcaga tgaaaaccta gctgattcct tggcgacgac aacatccctc cttgttccat 1320
 actttcttaa taattatttt tctcccaaaa agtccatcgc gctagcatca atgaagaaat 1380
 ataagaaaaa tcctcatatc cacatagtaa atagagcatt atgcggtcca tgtaggaatc 1440
 accttgggag cacctgcttg ctcaatcaca ctataaatac cacccataca ctgcttcaag 1500

<210> 6
 <211> 104
 <212> ADN
 <213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

5

<400> 6

agaaccatca cagacatacg ctacacgcac cctgtacgaa caaccaacct agctagctac 60
 ctactgaaaa cacacataag cttgctaggg agcatatcat agca 104

<210> 7

ES 2 769 898 T3

<211> 1407
 <212> ADN
 <213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

5

<400> 7

```

atcttcaaga tgtcgtaatc gatttcttga gtcaaatatt ttgttttcat attatttagg 60
gagtttttca tatggacaat acataaaaat atatatgcag tgcaagttat ttttgtttac 120
ttattcaatt tatccgttca atcccctaaa caaaatttta ccctaaacta ttttatttgg 180
tccaatctac accctaatta tatttctctt tttatttctc tgtgtctgag ttaaattttg 240
acttcaaatt ttatgaatag atgcaaaaaca tgatgcttta tgctaaaaat ttttactaag 300
aaattttctt tgttatgttc ataggtcaag aatatttaat atgaaattga tcttacatat 360
ataaaactgt acaaaaagta atcatgaaaa aaattaatat atttgttcta acatagagca 420
ttatgtataa gtcaactgac aaaatttgaa attaaaactc agcttgcatg tgaagaaaca 480
aaaaagaga aatctaatta ggggtagatt ggaccaata aatagttta agggggggta 540
aatgagcca aattttgttc aagggggtta gtggatcaag taaatagatg aggggggtaa 600
aatggacttt tttcaacaat taacctcatc tatagaaggg taggtgcatc tcagttcgaa 660
aaataagatg catttggatc ttgaaaaatc aatttcccct cacaccccca aatggaaatt 720
gtcgtcacta ctcagataac taatgaaagt agactcttat tgtgatgatc caaaaggctc 780
ctgtgattgg aatttcgtcc aactatttt cacaacatcg taatgagata taatattgtt 840
ccaccagaaa gcctacctgc atggtcattt ctaataacca actcaaaaaa tggtaaatga 900
catgctcttt tagtgaaaaa ctttaaggaa cctagcttgc caaaatttat ctttgtcatt 960
aacaactcag tttcaacat ccagtctcaa acaacttcac tttttttttt gcgggtaaaa 1020
caacttcact ttacatgtgg ccaaattgaa cacaacagtc acgtcccatt gaggtaccta 1080
gcaacttggg catcctttgt ctcgtacctc tacatatttt tgtccctgat caacacaaca 1140
ttcttaaac catttcttg gcatttgccc atgttacaag gcgcaaaaaca accaaccat 1200
atggcaattt actaaactaa actatgctga tccaatgcag caatcttgat cgctagtact 1260
gtccagcatt acatctgaaa caagtccaga tcacccatct catcacagtc acatgcatcc 1320
atggtcacgg gaaccgttaa cacacaccac caactaatcg gcattgctcc aatcctccta 1380
taaatacagc aacgatcagg cgagaca 1407
    
```

<210> 8
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

10

<400> 8

ES 2 769 898 T3

ataccaatc acacacagtg ttagcactta gcaaccgagg tatttctgcg agctttgtgc 60
 ccttcttggtg gtcgagtaat tagtagcaaa 90

<210> 9
 <211> 583
 <212> ADN
 <213> *Miscanthus sinensis f. gracillimus*
 <400> 9

5

tctgctagat gcaacgagct ggaagccagg cctgggacaa ctcgttgatg ggcgtggggt 60
 tcatcaaaca gagattagct tatcccattt tatgtagatg tgccatgtat gcatatgttt 120
 tggaataatg gtgactcgtg aggaagcccg tgcacatggt ttggaatgat ttctgccacc 180
 gatcgcagaa ttcaaaataa ggcgagcaca tcagtgtttc gttaaaataa taaacggtag 240
 attgaaataa tgattccagc tagcactata tattgtattt ctacgttaat aattttatat 300
 attgcataag ggtcctccta attcatgcat cactagtagc tagcacgttg agtgtatttg 360
 gcatgggtttc tcaacttgct tcccctgtat cctgatcgat ctctccttca taactggcac 420
 atcccaggac aaccaggcaa cgctcaaatc acacatgcgt tgctgattat ccacgctgca 480
 tgatgcacga agccaatcac taaagcatca ccttccacac catcgttcag ctataaaaac 540
 cctgccaaac tgcgtgagag gaccatccca aagcacaaga gca 583

<210> 10
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> *Miscanthus sinensis f. gracillimus*
 <400> 10

10

cgaagtgcag cactaaagca ccacttctctg ctcacaccgt tgtagtaata atccatcacc 60
 a 61

15

<210> 11
 <211> 1500
 <212> ADN
 <213> *Miscanthus sinensis f. gracillimus*
 <400> 11

20

ES 2 769 898 T3

ttgtgagaca aaaacactgt tgcggctggg aataagccgg ctgataagtt caagcgaaca 60
 ggctgtactt tagtgcttct atttgaacca ttggttctca ctctggctat gcattgttgc 120
 attctcactc tggcttataa ttttttcttg cctagtaata gtttttgaaa taatgggagc 180
 aaccacttca gttataatat aatgtttgta tgttataatg ggagcaatca ctctgggtaa 240
 ttggtgctcg tttataccat gcaggctgca ttatattaat tgcttagttc cttcttgttt 300
 gtatgtgact atgagatfff tgtgacctct acaggaagtg aagggaagag gattcctgct 360
 ggtttcaaca gacatagcaa gcaaaggggt tgcttctctg attgtgtatc tagatcacag 420
 tagtgtgaat gtgcaccaag caaaacttaa attaggtgct ctatccatgt acattaagcc 480
 tagctgtatc aaaaaaatt cggtgttctc tgcgtaatat tggatgtata tataagattc 540
 tggcattgga atttatattt tttttttggt ttttaattcat tatcacagac gcgtgttggg 600
 cgtgcgcgctc tgtcataagg tgtcgtcaca gacgcgtttt gactatacgc gtctgtgata 660
 gggttactac agacgcgtct ttactccacc agtctgtctt ataacctaata cgagacgcg 720
 tgtttgcata acgcagacgc ttattggtaa cacgcgtctg tagaagaaac ttattacaga 780
 cacgttatta agcgcgtctg tgatgtgtct taacacgcgt ctgtaatgtg gatttattac 840
 atagtgatcg gcccatatga acgaatgatc gatctaggcc caaagtagt gtatgaaatg 900
 ttcatttacg tttcaatgcy gtttctcaaa aaaaaacggt ccaatgctaa acaaaaacat 960
 aggaattata tagttttgct gtggcttagt aacttcgtcc aatcgtgcta gtttaatttg 1020
 tatatacctg taccatgcta ttcctctggc cttggttctt gcgcatccat tattaatgac 1080
 cacgccacgc cacgcattca ttcttaataca ccagttgctt gacatccaat gtcctctcca 1140
 ctacttgccg acaccgtctg atactccaag atcccaagct aagataacac ccagtgatca 1200
 tatatataaa aacaaacgcc agtgcgagcc tggccatttg cggagccaac cgaagccgtg 1260
 cacaaaatat tcgataccgt atcagggaaa aactagttta tacgaggtag gcaataatcc 1320
 atgtttcaaa aaaaacaggt aggcaataat ccagatcgga ctcttcctaa ccgggttcac 1380
 atgcatatat gaatatgatg gccgggttca catgaacgct agatatcgtg cctagtagtg 1440
 caccgatffc ttaatcccga ggctggacta taagtacccc tggtaacacc gtgatcaaag 1500

<210> 12

<211> 98

<212> ADN

<213> *Miscanthus sinensis f. gracillimus*

5

<400> 12

catcgcaaac aagctgctaa tcactttctca agagctctct aactacatta attagctaga 60
 gtgatccgcy aggtagctgg cttgtgatcg agcaatac 98

ES 2 769 898 T3

<210> 13
 <211> 740
 <212> ADN
 <213> *Tripsacum dactyloides*

5 <400> 13

aaatggatga aacaacttgg accaatcaga gatggccacg tcagctcccg atcgtcgtaa 60
 ccgaccaaac ccgatcgata acggtttagg ctccaataca ccgtcggtag caccggtcgc 120
 ctatcatctg cccccgtccc aacgctattg gtatcgtccg cccctatatac ggtcggtagc 180
 ccagtcacc gtcggggcca atcgtcccct gctgcgtccg ctcgtgtcgg taccgatcgc 240
 caaaaacgcc acgtcaacgg cactgcggta ccgaccgccg ctggcaccgg ccttagcggg 300
 ccacacgacc gatcgtctgt gtacggacgt agagggtgaat catgcgattg aattttcgcct 360
 agaggaaagt tatcatctta ttatctccaa ccctccttcc tacggctgga tccgacgaaa 420
 atttaccctg gacggtgcc a gtaacaattg caggctctac tcacgtgcta aatccagcaa 480
 tcaaacacga aggaatatac gtgatctggc cagaacatgc aagagaataa tacagtagtg 540
 ttagagtacg aaacctacac gattcaacga attaatacaat gggttcacgt tcacgggtat 600
 gctcgcgcac gtccaaaatc caacgacatt tttataagcg gcatgatcca gacgggccag 660
 ctcgagcacc acatggcgtg gctccatctc gcatccccca tcaccgctat aaataccatt 720
 ggccatgcac acccgcactc 740

<210> 14
 <211> 91
 <212> ADN
 <213> *Tripsacum dactyloides*

10 <400> 14

ccacacagca caagcagcag cagcagcagc agctc gatcgc aactagctta gctactacgt 60
 gcgcgtgcaa caagcagctc gatc gatcgc c 91

<210> 15
 <211> 903
 <212> ADN
 <213> *Tripsacum dactyloides*

15 <400> 15

20

ES 2 769 898 T3

actataattt tcatagagac catttctccc tccataccat ttaaaaaatt caaacaaaaa 60
 atatctataa gtggccctag gttaagaaaa gtgccagtgg aaatgcatct ttattgacgg 120
 ttttcttgta tctattgcca gtaaaaatca tatatttaca ttggcgattc tttgaagcat 180
 accgtcatga caaatctgat ttctattgac agaatgctta agagaatcgc tattgggtcat 240
 ttagttgcag catttaattg gtatgttagt ctatgaaata gggaaagtga attttgtatt 300
 gagagatatt gtttcattct tagttttacg acacctttga tgatgtagca gcgctggaaa 360
 gagtgttatg aaattcctat tgagaatagc cttacaggtc aacagcatac ttttaaaatt 420
 aaaccagaga tataccaaac ttcagtttct acgatataat atttttctac ctcataagtt 480
 ataatcagtg gtacctcctt ttttttatat ccctttatta aggacggtag agaacgtcct 540
 ctactcgtat gttgtacacc accggtaacg caattaagta aacatgcat gtcaagtagt 600
 aagtatataa gttggcaact caccagatgg caggagtccct gacccatcac cggctagcta 660
 tagctcttgt tacgtgaatt cagcatgatt gctcaacttg cttctgtatt tccacatggg 720
 ggagaattgt catatctccc cctaacaact ggcgcgtcca gagacaacca tgcaatgacc 780
 aaaccgatcg aatcacacat gctttgcagc attcatgtac caatgctgcc aagcacgaaa 840
 gcatctccct ctccgctcca tccatcgtca gctataaaaa ccatgccaaag caccctgtga 900
 aaa 903

5 <210> 16
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> *Tripsacum dactyloides*

<400> 16

gcatcccaaa gcacacaaga gcacgcagtg cagcactcaa gcacttcctg ctcaactgcac 60
 accgtacca 69

10 <210> 17
 <211> 1500
 <212> ADN
 <213> *Tripsacum dactyloides*

<400> 17

ES 2 769 898 T3

aaaaggcact tttctcaaga aacagagtta gagatcaaac caaagtgcta gaaacattgt 60
 aataggtatg tgcaacatat ttaaaggttc aaacctcaca gttttaccct ttttcacaaa 120
 gttgcacttc ctggcctcgt ttaagcttat ttggacttag aatcttcaaa ttgtgctcga 180
 ttgaaccttt actcatatac ttagcaaaca agttagtcca agatgttgtg ttggacattc 240
 aatcaccaaa acttatggaa atggcttaat tgccccattc cctttcatgg tacaatttgt 300
 ttcacagatt taagcagaag ctatatcaaa cacggcgctt ctacaacagc ttatcagttt 360
 agttgcttct cagaatgaaa ggtaataaac ataagctgct ttttactaga tccttagata 420
 agttgctttt ttaacaagca gctctgcaa gcagggccat agtgccatgt tgtaggctgg 480
 tcgctttccc gagccatatg aaggctcgtg gtccatgtgg ctgaaattaa agttgatag 540
 cccatcggaa caaatggtca attagaggcc caaaatttgt gagtcaaatt ttcatttaca 600
 cttccacgct agtaaacgaa aacatatata gtacctatat atcgattttt tttttctggt 660
 gtcttagaaa cttcgtccaa taatcatgct agtttaattt gtatacctgc acaaagctat 720
 tcctctggcc ttggttcttt gcgcgtccat gcttgtttat ggatgattgc agccacgcca 780
 cgcattcatt ctcaatcacc atttgottga catctaattg cctctgcacc acttgcgcac 840
 gctacacacc gtctgatacg ccaggatccc aagctaaaat aacaccaat gatcatgtga 900

 aaacaagtga cagtgcgagc cagcccatgc agcgatcttg gccatttgcg gagccaaccg 960
 aagccgtgca caaaatattc gataccgtat aaggggaaac actagttata cgaggtaggc 1020
 aatataatc ctcttcctaa ccggcgcccg gggtcacatg catatatgat ggccgccagc 1080
 cggggtcaca tgatgaacgc tatggtgoc t agtgcacgat ttattaatct cccgaggctg 1140
 tactataaat acatcggtaa tactgtgatc aaagcatcgc aaagaagatc tctaagactg 1200
 tctccagcaa cgtcctctat atctatcctc tatatctgtc ctttacagtc tcctctaaaa 1260
 gattccatcc tctatatctc cttcctctcc aacaacggcc tctaaatcac gtcctctata 1320
 cgcaaatacc tatattagag acatttttaa ttttttaatt tttgtacata cgtatttgtc 1380
 atactctcaa atgtattgta catattttag ttttgctaaa ccggttgttt aaagtattca 1440
 aatggataga ggagaggaga gagaaactct atatatagag gatccagcag cgtcctctaa 1500

<210> 18
 <211> 172
 <212> ADN
 <213> *Tripsacum dactyloides*

 <400> 18

5

ES 2 769 898 T3

atttagagga ccgtttagag gacgctgctg gagggagtag aggacgacag cgttctctaa 60
aatttagagt acaggatact ttagaggacc tgctggaggc agtctaacaa ctgcatttgg 120
ctagagagag tgatcgcgag gtagctagct ggcttgtgat cgatcgagca aa 172

<210> 19
<211> 645
<212> ADN

5 <213> *Saccharum officinarum*

<400> 19

caaattaaag ttgataggcc catcggaga aatgatcaat gtaaggccca aaatttgtgt 60
ctgaaatggt cgtttacatt ttcaagctaa ataaaaacat aggaattata tagttttgct 120
ggtggcttag aaacttcgtc caaaatatta aaaaaaaga aaagaaactt cgtccaaaat 180
ggtgcttagt ttaatttgta tacctgcacc atgctattcc tctggccttg ttcttttgcg 240
catctatcca tgcctatgga tgatcgcagc cacgccacgc aattcattct taatcaccat 300
ttgcttgaca tccaatgtcc totacaccac caacttgcgca ccctacacac cggccatttg 360
atagccaag atcccaagct gaaataacac ccaatgatca tatgaaaaca agcgtgagtg 420
cgagcctgcc catgcagcga tcttggccat ttgctggagcc aaccgaagcc cgtgcacaaa 480
atattcgaga ccgtataagg gaaaacacta gttatacgca atgtccacaa taatccagat 540
cgactcttcc taaccggggt cacatgaacg ctggttggtcc tagtgcaccg atttcttaaa 600
tcccaaggct cgactataaa taccctggt atttgcaccg tgatc 645

<210> 20
<211> 86
<212> ADN

10 <213> *Saccharum officinarum*

<400> 20

aaagcatcgc aaacaagcta aagagctctc taactacatt gattagagtg atctgcgcta 60
gaaggaggct agcttgtgat cgagca 86

15

<210> 21
<211> 1563
<212> ADN
<213> *Setaria italica*

20 <400> 21

ES 2 769 898 T3

agaccagca acctaccgag ggggtacccg aggtagtgtt ttgtggtggg gctcgtcgaa 60
 gatcaggaac ttgaagggtga actcgaacac acgatttaga caagttcggg ctgcttatgc 120
 cgcataatac cccatgtcat gtgtgttggg tggattgtat tgattgatca gatatttggg 180
 gggggccctg cctcgcctta tattgcccct tgccggaggc agggctacag gtcggttgtt 240
 gtacaagagt actagtggg tttgaccagc gagtcctact ctaattgcta caagtagttt 300
 cctaactcct gactagtctt tgtccgccac gtagaccacg acgtcttgca cctagtctct 360
 gtgtttgata catcttgggtg tacagtccga tattgttagga ctatccaagc ttcccagtag 420
 gcccatagat gtatggccga caactggata atgtaactct gggtcagtac tatccttctc 480
 tatatagaca caaacaacgt actatagcag aagttaaagc tcgtaacca ccaatatttg 540
 gtggcataga ccacgtattg ctgatatagt gctcgttaacc caccaatatt tcgtggcata 600
 gagatctctt aggcaataaa ttagcagtac gaaacaatct atgtccacgt gttgctaata 660
 caatgttcta aaccttacag cctactggac agttctctag ccatgatata tgtgcatgtc 720
 cgaacaaata tttatgggta cccgaaagggt taatTTTTTg tagtatttat gagggggagg 780
 ggggcggtga cgaaaaaat aacttagcta agcgtaattg gcttaaaaaac atacaatggt 840
 gttccagcat caagcctacg tgatcatttc acaaaaccaa ctcaaaagat aggtgtcatg 900
 ttccttttag tgcaaaactt aaggacacct accttgcaaa acttagcttt gttaccaga 960
 atgaaccgct aagctcgagg agctctgaac ttacatgacc aaatatatta aacacaaaag 1020
 tcatgcatga ttttctttaa taagtatcga gcaatatggg tcgggtgtct ttcgtctcat 1080
 acctctattg tcctccgtga tcaacaaggg tggatccggg tggtgcaagg gggctcaagc 1140
 ccccctacct ctcccaaagg agaaagaagg gagaagaaag tgaaggaaga agaaaccccc 1200
 tatattctaa tgctacctcc gccactgctg atcaacacaa cattcttaa accatttcct 1260
 tggcatttgc gcatgttaca aggtacaaaa gagccagccc atatgccaag ttactaaact 1320
 aaactatgat ccaccatgga gcgagaacaa acgtcaacag gcatcaacca atgcagcaat 1380
 cttgatcgct agtactgtcc ggcattatat ctgaaacaaa tccagatcac ccatctctc 1440
 acagtacat gcattcatgg tcacgggaac cgtttagcaaa ccaccaacta atcagcattg 1500
 caacactctt cctcctataa atgcagcgag cgggggacac cataaacctat cacaggcact 1560
 tag 1563

<210> 22
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

5

<400> 22

ES 2 769 898 T3

cgatcaagtt aatdddgttt ctgctttgtg cgctgtgtt ccagtaatta ctttccgtgt 60

agcaaaa 67

<210> 23
 <211> 1528
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

5

<400> 23

ggaagctaac tagtcacggc gaatacatga cgacatcggc ctacaacgca caacttcttg 60

gcataaaagc ttcaatttca atgccctat ctggaagccc taggcgccgc gcaaatgtaa 120

aacattcgct tcgcttggct tgttatccaa aatagagtat ggacctccga cagattggca 180

accctgggt aatcgaaaat ggctccatct gccctttgt cgaaggaatc aggaaacggc 240

cctcacctcc tggcggagt tagatatgtg aaagaatcta ggcgacctt gcagactgga 300

caacatgtga acaataaga ccaacgttat ggcaacaagc ctcgacgcta ctcaagtggc 360

gggaggccac cgcatttcc aacgaagcgc caaagaaagc cttgcagact ctaatgctat 420

tagtcgccta ggatatttgg aatgaaagga accgcagagt ttttcagcac caagagcttc 480

cggtggctag tctgatagcc aaaattaagg aggatgcaa aacatgggtc ttggcggcg 540

cgaaacacct tgataggtgg cttacctttt aacatgttcg ggccaaagc cttgagacgg 600

taaagttttc tatttgcgct tgcgcattga caattttatt cctctattca atgaaattgg 660

tggctcactg gttcattaaa aaaaaagaa tctagcctgt tcgggaagaa gaggatttta 720

ttcgtgagag agagagagag agagagagag agagggagag agaaggagga ggaggatttt 780

caggcttcgc attgcccac ctctgcttct gttggcccaa gaagaatccc aggcgcccac 840

gggctggcag tttaccacgg acctacctag cctaccttag ctatctaagc gggccgacct 900

agtagctacg tgcctagtgt agattaaagt tggcgggcca gcaggaagcc acgctgcaat 960

ggcatcttcc cctgtccttc gcgtacgtga aaacaaacc aggtaagctt agaatcttct 1020

tgcccgttgg actgggacac ccaccaatcc caccatgcc cgatattcct ccggtctcgg 1080

ttcatgtgat gtcctctctt gtgtgatcac ggagcaagca ttcttaaagc gcaaaagaaa 1140

atcaccaact tgctcacgca gtcacgctgc accgcgcgaa gcgacgccc ataggccaag 1200

atcgcgagat aaaataacaa ccaatgatca taaggaaaca agcccgcgat gtgtcgtgtg 1260

cagcaatctt ggtcatttgc gggatcgagt gcttcacggc taaccaaata ttcggccgat 1320

gatttaacac attatcagcg tagatgtacg tacgatttgg taattaatct acgagccttg 1380

ctagggcagg tgttctgcca gccaatccag atcgccctcg tatgcacgct cacatgatgg 1440

cagggcaggg ttcacatgag ctctaacggc cgattaatta atcccggggc tcgactataa 1500

atacctccct aatcccatga tcaaaacc 1528

ES 2 769 898 T3

<210> 24
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*
 5 <400> 24
 atctcaagca gcctaatacat ctccagctga tcaagagctc ttaattagct agctagtgat 60
 tagctgcgct tgtgatcgat cgatctcggg tacgtagca 99
 <210> 25
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 15 <223> Cebador de amplificación RCc3_Inter_1.
 <400> 25
 cagcacgttg gcgcacacgc ccagctt 27
 <210> 26
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 25 <223> Cebador de amplificación RCc3_Outer_1.
 <400> 26
 gcacaccgcs gcctcsaggt cgacgag 27 <210> 27
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 35 <223> Cebador de amplificación RCc3_Inter_2.
 <400> 27
 aggttgatgc cgagsatggt gsccttg 27
 <210> 28
 <211> 28
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(28)
 45 <223> Cebador de amplificación RCc3_Outer_2.
 <400> 28
 cttgccgcag trgttgagga kgaggctg 28
 <210> 29
 <211> 2001
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<221> misc_feature

<222> (1). (2001)

<223> Secuencia codificante de GUS con el codón rediseñado con intrón procesable.

<400> 29

5

```

atggtgaggc ccgttgagac cccgactagg gagatcaaga agctggacgg cctctgggcc 60
ttctccctcg accgtgagaa ctgcggcatc gaccagcgct ggtgggagtc cgccctccag 120
gagtctaggg ccatcgccgt gcccggtttc ttcaacgacc agttcgccga cgccgacatc 180
cgcaactacg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaggtgt tcatcccga gggctgggcg 240
ggccagcgca tcgtgctccg cttcgacgcc gtgaccact acggcaaggt ctgggtgaac 300
aatcaggagg taagtttctg cttctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta 360
gtagtaatat aatatttcaa atattttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 420
gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca 480
aaatttggtg atgtgcaggt gatggagcac cagggcgggt acaccccgtt cgaggccgac 540
gtgacgccgt acgtgatcgc cgggaagtcc gtccgcatca ccgtctgcgt gaacaatgag 600

```

ES 2 769 898 T3

ctgaactggc agaccatccc gcctggcatg gtcatacccg acgagaacgg caagaagaag 660
cagtcctact tccacgactt cttcaactac gctggcatcc accgctccgt gatgctctac 720
accactccca acacctgggt ggacgacatc accgtggtca cccacgtggc ccaggactgc 780
aaccacgcct ccgtggactg gcaagtcggt gccaacggcg acgtcagcgt cgagctgcgc 840
gacgcccgacc agcaagtcgt tgccaccggc cagggcacca gcggcaccct ccaagtcgtc 900
aacctcacc tctggcagcc tggcgagggc tacctctacg agctgtgcgt caccgccaag 960
agccagactg agtgcgacat ctaccctctc cgcgtcggca tcaggagcgt cgctgtcaag 1020
ggcgagcagt tcctcatcaa ccacaagcct ttctacttca ctggtttcgg ccgccacgag 1080
gacgctgacc tgaggggcaa gggtttcgac aacgtcctga tgggccacga ccacgctctg 1140
atggactgga tcggtgccaa cagctacagg accagtcact acccgtacgc tgaggagatg 1200
ctggactggg ctgacgagca cggtatcgtc gtgatcgacg agactgctgc ggtcggtttc 1260
aacctgtctc tgggcattgg tttcgaggct gggacaagc cgaaggagct gtactctgag 1320
gaagctgtca acggcgagac tcagcaagct catctccagg cgattaagga gctgattgcc 1380
agggacaaga accatccgtc tgtcgtgatg tggctctattg cgaatgagcc ggacaccaga 1440
ccgcaagggg cgcgtgaata cttcgcgccg ctggcggagg cgactcgcaa actggacca 1500
accctccaa tcacgtgcgt caatgtcatg ttctgcgacg cccatacggg tacgatctcg 1560
gacctgttcg atgttctttg tctcaatcgg tactatgggt ggtatgttca gagcggggat 1620
cttgagacgg cggagaaggt tcttgagaag gaactcctgg cgtggcaaga gaagctccat 1680
cagccgatca ttatcacgga gtacgggggt gacacacttg cgggccttca cagtatgtac 1740
acagatatgt ggtcggagga ataccagtgt gcatggttgg atatgtacca tcgtgtcttc 1800
gaccgggttt cagcggttgt cggcgaacaa gtctggaact tcgcagactt cgccacgagc 1860
caagggatac tgcgggtagg agggacaag aagggaatct tcacacggga tcggaagccc 1920
aagtcagcag ccttcctggt gcagaagcga tggacaggaa tgaacttcgg agaaaagcca 1980
cagcaaggcg gaaagcagtg a 2001

<210> 30
<211> 1812
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1812)
<223> Secuencia codificante de GUS con el codón rediseñado.

10 <400> 30

atggtgagggc ccgttgagac cccgactagg gagatcaaga agctggacgg cctctggggc 60

ES 2 769 898 T3

ttctccctcg accgtgagaa ctgcggcatc gaccagcgcct ggtgggagtc cgccctccag 120
 gagtctaggg ccatcgccgt gcccggttcc ttcaacgacc agttcgccga cgccgacatc 180
 cgcaactacg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaggtgt tcatcccga gggctgggag 240
 ggccagcgca tcgtgctccg cttcgacgcc gtgaccact acggcaaggt ctgggtgaac 300
 aatcaggagg tgatggagca ccagggcggt tacaccccggt tcgaggccga cgtgacgccg 360
 tacgtgatcg ccgggaagtc cgtccgcatac accgtctgcg tgaacaatga gctgaactgg 420
 cagaccatcc cgcctggcat ggtcatcacc gacgagaacg gcaagaagaa gcagtcctac 480
 ttccacgact tcttcaacta cgctggcatc caccgctccg tgatgctcta caccactccc 540
 aacacctggg tggacgacat caccgtggtc acccagctgg cccaggactg caaccacgcc 600
 tccgtggact ggcaagtcgt tgccaacggc gacgtcagcg tcgagctgcg cgacgccgac 660
 cagcaagtcg ttgccaccgg ccagggcacc agcggcacc tccaagtcgt caaccctcac 720
 ctctggcagc ctggcgaggg ctacctctac gagctgtgcg tcaccgcaa gagccagact 780
 gagtgcgaca tctaccctct ccgcgtcggc atcaggagcg tcgctgtcaa gggcgagcag 840
 ttctcatca accacaagcc tttctacttc actggtttcg gccgccacga ggacgctgac 900
 ctgaggggca agggtttcga caacgtcctg atggtccacg accacgctct gatggactgg 960
 atcggtgcca acagctacag gaccagtcac taccgctacg ctgaggagat gctggactgg 1020
 gctgacgagc acggtatcgt cgtgatcgac gagactgctg cggtcggttt caacctgtct 1080
 ctgggcattg gtttcgaggg tgggaacaag ccgaaggagc tgtactctga ggaagctgtc 1140
 aacggcgaga ctgagcaagc tcatctccag gcgattaagg agctgattgc cagggacaag 1200
 aaccatccgt ctgtcgtgat gtggtctatt gcgaatgagc cggacaccag accgcaaggg 1260
 gcgcgtgaat acttcgcgcc gctggcggag gcgactcgca aactggacc aaccctcca 1320
 atcacgtgcg tcaatgtcat gttctgcgac gcccatcagg atacgatctc ggacctgttc 1380
 gatgttcttt gtctcaatcg gtactatggg tggatgttc agagcgggga tcttgagacg 1440
 gcggagaagg ttcttgagaa ggaactcctg gcgtggcaag agaagctcca tcagccgatc 1500
 attatcacgg agtacggggt tgacacactt gcgggccttc acagtatgta cacagatatg 1560
 tggtcggagg aataccagtg tgcattggtg gatatgtacc atcgtgtctt cgaccggggt 1620
 tcagcgggtg tcggcgaaca agtctggaac ttcgcagact tcgccacgag ccaagggata 1680
 ctgcccgttag gagggaaaca gaagggaaac ttcacacggg atcggaaagcc caagtcagca 1740
 gccttcctgt tgcagaagcg atggacagga atgaacttcg gagaaaagcc acagcaaggg 1800
 ggaaagcagt ga 1812

<210> 31
 <211> 1812

ES 2 769 898 T3

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 31

atggtccgtc ctgtagaaac cccaacccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
 ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttacia 120
 gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt tttaacgata agttcgccga tgcagatatt 180
 cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataaccga aggttgggca 240
 ggccagcgtg tctgtctgctg tttcagatgct gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300
 aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgcctat ttgaagccga tgtcacgccc 360
 tatgttattg cgggaaaaag tgtacgatac accgtttgtg tgaacaacga actgaactgg 420
 cagactatcc cgccgggaat ggtgattacc gacgaaaaac gcaagaaaaa gcagtcttac 480
 ttccatgatt tctttaacta tgccggaatc catcgcagcg taatgctcta caccacgccc 540
 aacacctggg tggacgatat caccgtggtg acgcatgtcg cgcaagactg taaccacgcg 600
 tctgttgact ggcaggtggt ggccaatggt gatgtcagcg ttgaactgctg tgatgcggat 660
 caacaggtgg ttgcaactgg acaaggcact agcgggactt tgcaagtggt gaatccgcac 720
 ctctggcaac cgggtgaagg ttatctctat gaactgtgctg tcacagccaa aagccagaca 780
 gagtgtgata tctaccgctt tccgctcggc atccggctcag tggcagtgaa gggcgaacag 840
 ttcctgatta accacaaaacc gttctacttt actggctttg gtcgtcatga agatgcggac 900
 ttgctgaggc aaggattcga taacgtgctg atggtgcacg accacgcatt aatggactgg 960
 attggggcca actcctaccg tacctcgcct tacccttacg ctgaagagat gctcactggt 1020
 gcagatgaac atggcatcgt ggtgattgat gaaactgctg ctgtcggctt taacctctct 1080
 ttaggcattg gtttcgaagc gggcaacaag ccgaaagaac tgtacagcga agaggcagtc 1140
 aacggggaaa ctcagcaagc gcacttacag gcgattaag agctgatagc gcgtgacaaa 1200
 aaccacccaa gcgtggtgat gtggagtatt gccaacgaac cggataaccg tccgcaaggt 1260
 gcacgggaat atttcgcgcc actggcggaa gcaacgcgta aactcgaccc gacgcgtccg 1320
 atcacctgct tcaatgtaat gttctgcgac gctcacaccg ataccatcag cgatctcttt 1380
 gatgtgctgt gcctgaaccg ttattacgga tggatgtcc aaagcggcga tttggaaacg 1440
 gcagagaagg tactggaaaa agaacttctg gcctggcagg agaaactgca tcagccgatt 1500
 atcatcaccg aatacggcgt ggatacgtta gccgggctgc actcaatgta caccgacatg 1560
 tggagtgaag agtatcagtg tgcattgctg gatatgtatc accgcgtctt tgatcgcgctc 1620
 agcgcctgct tccgtgaaca ggtatggaat ttcgccgatt ttgcgacctc gcaaggcata 1680
 ttgcgcgttg gcggtaaaaa gaaagggatc ttcactcgcg accgcaaacc gaagtcggcg 1740

ES 2 769 898 T3

gcttttctgc tgcaaaaacg ctggactggc atgaacttcg gtgaaaaacc gcagcagggg 1800
 ggcaacaat ga 1812

<210> 32
 <211> 2001
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1). (2001)
 <223> Secuencia codificante quimérica comprendida por la secuencia codificante de GUS de E. coli con un intrón procesable.

10

<400> 32

atggtccgtc ctgtagaac cccaaccggt gaaatcaaaa aactcgacg cctgtgggca 60
 ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttacia 120
 gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt tttaacgatc agttcgccga tgcatatatt 180
 cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240
 ggccagcgtg tcgtgctgcg tttcgatgcg gtcactcatt acggcaaaagt gtgggtcaat 300
 aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccc 360
 tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtaag tttctgcttc tacctttgat atatatataa 420
 taattatcat taattagtag taatataata tttcaaatat ttttttcaaa ataaaagaat 480
 gtagtatata gcaattgctt ttctgtagtt tataagtgtg tatattttaa tttataactt 540
 ttctaataata tgaccaaaat ttgttgatgt gcaggtatca ccgtttgtgt gaacaacgaa 600
 ctgaactggc agactatccc gccgggaatg gtgattaccg acgaaaacgg caagaaaaag 660
 cagtcttact tccatgattt ctttaactat gccggaatcc atcgcagcgt aatgctctac 720
 accacgcccga acacctgggt ggacgatatc accgtggtga cgcattgctgc gcaagactgt 780
 aaccacgctg ctgttgactg gcaggtggtg gccaatggtg atgtcagcgt tgaactgctg 840
 gatgcggatc aacaggtggt tgcaactgga caaggcacta gcgggacttt gcaagtggtg 900
 aatccgcacc tctggcaacc ggggtgaaggt tatctctatg aactgtgctg cacagccaaa 960
 agccagacag agtgtgatat ctaccgctt cgcgtcggca tccggtcagt ggcagtgaag 1020
 ggcaaacagt tcctgattaa ccacaaaccg ttctacttta ctggctttgg tcgtcatgaa 1080
 gatgcggact tgcgtggcaa aggattcgat aacgtgctga tgggtgcacga ccacgatta 1140
 atggactgga ttggggccaa ctctaccggt acctcgcatt acccttacgc tgaagagatg 1200
 ctcgactggg cagatgaaca tggcatcgtg gtgattgatg aaactgctgc tgtcggcttt 1260
 aacctctctt taggcattgg tttcgaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcga 1320
 gaggcagtca acggggaaac tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg 1380

ES 2 769 898 T3

cgtgacaaaa accaccaag cgtggtgatg tggagtattg ccaacgaacc ggataccctg 1440
 ccgcaagggtg cacgggaata tttcgcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgaccctg 1500
 acgcgtccga tcacctgctg caatgtaatg ttctgcgacg ctcacaccga taccatcagc 1560
 gatctctttg atgtgctgtg cctgaaccctg tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat 1620
 ttggaacgag cagagaaggt actggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat 1680
 cagccgatta tcatcaccga atacggcgtg gatacgttag ccgggctgca ctcaatgtac 1740
 accgacatgt ggagtgaaga gtatcagtgt gcatggctgg atatgtatca ccgcgtcttt 1800
 gatcgcgtca gcgccgtcgt cggtaaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg 1860
 caaggcatat tgcgcgttgg cggtaacaag aaagggatct tcaactcgca ccgcaaaccg 1920
 aagtcggcgg cttttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaaccg 1980
 cagcagggag gcaacaatg a 2001

<210> 33
 <211> 435
 <212> ADN
 <213> *Setaria italica*

5

<400> 33

ggcgcccttt gagaagaagc ttttggctctg ctgcgcttat catgttttgt ggcttctgtg 60
 ttgtgattct tgatctgccc cttgctatca tttgtattgt actgtcctaa taagtgttac 120
 ttgtgagggt attactgtgt ctggttatct acctagagga ggaattattg tctgctatct 180
 ctggttttgc tgtttatgta atggtgaacc aaagaatgaa gctgcaggct actttgagaa 240
 ggaaggggac ctgctgcttt ctatcttctg atgcgtgatt acttgaacag tcctgatgat 300
 ctattaatgt tctttggctca gtgcaagtgt ttggtgtagc tccaacaggt agtgtttatg 360
 tttggtgaag cagcaatggc cgactgtatg tgtttgggtga agctgcaacc tgcttctgct 420
 aactgaacat gcaga 435

<210> 34
 <211> 2219
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1). (2219)
 <223> Grupo de elementos transcripcionales quiméricos reguladores de la expresión (EXP).

15

<400> 34

attatggcca attatttatc ggcttggctc tggcaggatg agttagtag tgtaacctaat 60

ES 2 769 898 T3

ttggtaggca atggggttga gttaggccaa taaatgtgca ggtttacatt tggttgcat 120
 gttagtcat aacttcatac acttcattt ttgtacgtcg gcgatgtttc aaccagaaca 180
 gattatgttt ccttgggact gtaaatttct tcatcgctcc atcccaatga acttgcaaga 240
 gattcgtggt agcaacccaaa attgctctgt ccttcccaaa aagcattgcc tctggatcct 300
 ttccgatcaa gatcagaaac cctatatgta ttgttcttat gttctgctgt gggcgttgg 360
 ttcttgtcac ccttaaactt ctctgtttgg taccagata aatacaaat cggctggtgg 420
 gtagaaaaac cgcctacgaa cactggtttc acctataag actactgcac tgtttctagc 480
 aggcttattt ttctcttctg tttttatatt ccaatgtata catattaatg tttatcgagc 540
 tatgatctta taaatttgta catgcttcaa tattttctaa aaacttgaat aacagtatgt 600
 aaaacctagg ttgatgtttc aaatgaactt atttaacatt ttacgttgaa acagtacatc 660
 gcgaatggca tattattttg ttgcatttat tctaaacacc ttaaaatgga atttgaaaac 720
 gggctctaag tttgagagaa gtttaaggtt aatagtattc taaacacttc aagtttgaga 780
 tccaaaataa ttaatctctc acctatcacc tccaatcaag ttgtttatca gtttatgcca 840
 tgtacatgta tcgctggttt gttatttcac ctcattttct ctatgtatct actactattg 900
 cgctaactctc aatattaga tgacatgtaa actaaaatct ttggaaagat taataggata 960
 cccgcgggtg ctgatatctg tttctaaaaa tgttgaatct aactatttgt aatattgat 1020
 atatttttca gaaatgttgg atttagtctt gtgaaatgtt gaaccgatat ctctgatatg 1080
 gatttaatgg gcttaaagct tccactagcc gtgtgcatgg gcgaaaaaaa atcttggcca 1140
 agtgttactc cgtcgcggcc acacgccaca agtcctcccg gccctcgcct gcccttctc 1200
 ccatcgtacc cgccacacgg cgcgccacca gtggcgcgcg ggatgcgctt catctccccg 1260
 gcggccacct cgcgcggttt agatttcctt gggccccctt cgcggtaccg tcacatattt 1320
 ttggcgcctc ttcttctgcg ccctctctct cccgaaccgc agataccacc gagtcggcag 1380
 ctgaacacaa gcaacaagca agtgatcccg gaccgaccgt cttcggtagc cgctcactcc 1440
 gccctctgcc tttgttactg ccacgtttct ctgaatgctc tcttgtgtgg tgattgctga 1500
 gagtggttta gctggatcta gaattacact ctgaaatcgt gttctgcctg tgctgattac 1560
 ttgccgtcct ttgtagcagc aaaatatagg gacatggtag tacgaaacga agatagaacc 1620
 tacacagcaa tacgagaaat gtgtaatttg gtgcttagcg gtatttattt aagcacatgt 1680
 tgggtgttata gggcaacttg attcagaagt ttgctgttaa tttaggcaca ggcttcatac 1740
 tacatgggtc aatagtatag ggattcatat tataggcgat actataataa tttgttcgctc 1800
 tgcagagctt attatttgcc aaaattagat attcctattc tgtttttggt tgtgtgctgt 1860
 taaattgtta acgcctgaag gaataaatat aatgacgaa attttgatgt ttatctctgc 1920
 tcctttattg tgaccataag tcaagatcag atgcacttgt tttaaatatt gttgtctgaa 1980

ES 2 769 898 T3

gaaataagta ctgacagtat tttgatgcat tgatctgctt gtttgttgta acaaaattta 2040
 aaaataaaga gtttcctttt tgttgctctc cttacctcct gatggtatct agtatctacc 2100
 aactgacact atattgcttc tctttacata cgtatcttgc tcgatgcctt ctccttagtg 2160
 ttgaccagtg ttactcacat agtctttgct catttcattg taatgcagat accaagcgg 2219

<210> 35
 <211> 2224
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2224)
 <223> Grupo de elementos transcripcionales quiméricos reguladores de la expresión (EXP).

10

<400> 35

attatggcca attatattatc ggcctgggtcc tggcaggatg agtgtagtag tgtacctaat 60
 ttggtaggca atgggtttga gttaggccaa taaatgtgca ggtttacatt tggttgccat 120
 gttagtcat aacttcatac acttccattt ttgtacgtcg gcgatgtttc aaccagaaca 180
 gattatgttt ccttgggact gtaaatttct tcatcgctcc atcccaatga acttgcaaga 240
 gattcgtggt agcaacccaaa attgctctgt ccttcccaaaa aagcattgcc tctggatctt 300
 ttccgatcaa gatcagaaac cctatatgta ttgttcttat gttctgctgt gggctcgttg 360
 ttcttgtcac ccttaaactt ctctgtttgg taccagata aatacaaatt cggctggtgg 420
 gtagaaaaac cgcctacgaa cactggtttc acctataag actactgcac tgtttctagc 480
 aggcttattt ttctcttctgt tttttatatt ccaatgtata catattaatg tttatcgagc 540
 tatgatctta taaatttgta catgcttcaa tattttctaa aaacttgaat aacagtatgt 600
 aaaacctagg ttgatgtttc aatgaactt atttaacatt ttacgttgaa acagtacatc 660
 gcgaatggca tattatatttg ttgcatttat tctaaacacc ttaaaatgga atttgaaaac 720
 gggctctaag tttgagagaa gtttaagggt aatagtattc taaacacttc aagtttgaga 780
 tccaaaataa ttaatctctc acctatcacc tccaatcaag ttgtttatca gtttatgcc 840
 tgtacatgta tcgctgggtt gttatttcac ctcatcttctg ctatgtatct actactattg 900
 cgctaactctc aaatattaga tgacatgtaa actaaaatct ttggaaagat taataggata 960
 cccgcgggtg ctgatatctg tttctaaaaa tgttgaatct aactatgtt aaatattgat 1020
 atatatttca gaaatgttg atttagtctt gtgaaatggt gaaccgatat ctctgatatg 1080
 gatttaatgg gcttaaagct tccactagcc gtgtgcatgg gcgaaaaaaa atcttgcca 1140
 agtgttactc cgtcgcggcc acacgccaca agtcctcccg gccctcgctc gcccttattc 1200

ES 2 769 898 T3

ccatcgtacc cgccacacgg cgcgccacca gtggcgccgc ggatgcgcct catctccccg 1260
gcggccacct cgcgcgggtt agatttcctt gggccccctt cgcggtaccg tcacatattt 1320
ttggcgcttc ttcttctgag cccctctcct cccgaaccgc agataccacc gagtcggcag 1380
ctgaacacaa gcaacaagca agtgatcccc gaccggaccg accgtcttcg gtacgcgctc 1440
actccgccct ctgcctttgt tactgccacg tttctctgaa tgctctcttg tgtggtgatt 1500
gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt aactctgaa atcgtgttct gcctgtgctg 1560
attacttgcc gtcctttgta gcagcaaaat atagggacat ggtagtacga aacgaagata 1620
gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttggtgct tagcgggtatt tatttaagca 1680
catgttggtg ttatagggca cttggattca gaagtttgct gttaatttag gcacaggctt 1740
catactacat gggccaatag tatagggatt catattatag gcgatactat aataatttgt 1800
tcgtctgcag agcttattat ttgccaaaat tagatattcc tattctgttt ttgtttgtgt 1860
gctgttaaat tgtaaacgcc tgaaggaata aatataaatg acgaaatfff gatgtttatc 1920
tctgctcctt tattgtgacc ataagtcaag atcagatgca cttgttttaa atattgttgt 1980
ctgaagaaat aagtactgac agtattttga tgcattgatc tgcttgtttg ttgtaacaaa 2040
atftaaaaat aaagagtttc ctttttgttg ctctccttac ctctgatgg tatctagtat 2100
ctaccaactg aactatatt gcttctcttt acatacgtat cttgctcgat gccttctccc 2160
tagtgttgac cagtgttact cacatagtct ttgctcattt cattgtaatg cagataccaa 2220
gcgg 2224

<210> 36
<211> 2966
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2966)
<223> Grupo de elementos transcripcionales quiméricos reguladores de la expresión (EXP).

10 <400> 36

ggtccgattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60
ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc 120
catcattgag ataaaggaaa ggccatcggt gaagatgcct ctgccgacag tgggtccaaa 180
gatggacccc caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca 240
aagcaagtgg attgatgtga tgggtccgatt gagacttttc acaaagggtt aatatccgga 300
aacctcctcg gattccattg ccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaagg 360
gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420

ES 2 769 898 T3

tctgccgaca gtggtcccaa agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480
gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atcggaagct aactagtcac 540
ggcgaataca tgacgacatc ggctacaac gcacaacttc ttggcataaa agcttcaatt 600
tcaatgcccc tatctggaag ccctaggcgc cgcgcaaagt taaaacattc gcttcgcttg 660
gcttgttatc caaaaatagag tatggacctc cgacagattg gcaacccgtg ggtaatcgaa 720
aatggctcca tctgccctt tgtcgaagga atcaggaaac ggccctcacc tccctggcga 780
gtgtagatat gtgaaagaat ctaggcgaca cttgcagact ggacaacatg tgaacaaata 840
agaccaacgt tatggcaaca agcctcgacg ctactcaagt ggtgggaggc caccgcatgt 900
tccaacgaag cgccaaagaa agccttgacg actctaattc tattagtcgc ctaggatatt 960
tggaatgaaa ggaaccgcag agtttttcag caccaagagc ttccggtggc tagtctgata 1020
gccaaaatta aggaggatgc caaaacatgg gtcttgccgg gcgcgaaaca ccttgatagg 1080
tggcttacct tttaacatgt tcgggccaaa ggccttgaga cggtaaagtt ttctatttgc 1140
gcttgccgat gtacaatttt attcctctat tcaatgaaat tggaggctca ctggttcatt 1200
aaaaaaaaa gaatctagcc tgttcgggaa gaagaggatt ttattcgtga gagagagaga 1260
gagagagaga gagagaggga gagagaagga ggaggaggat tttcaggctt cgcattgccc 1320
aacctctgct tctgttgcc caagaagaat cccaggcgc catgggctgg cagttaacca 1380
cggacctacc tagcctacct tagctatcta agcgggccga cctagtagct acgtgcctag 1440
tgtagattaa agttggcggg ccagcaggaa gccacgctgc aatggcatct tcccctgtcc 1500
ttcgcgtacg tgaaaacaaa cccaggtaag cttagaatct tcttgcccgt tggactggga 1560
caccaccaa tcccaccatg ccccgatatt cctccggtct cggttcatgt gatgtcctct 1620
cttgtgtgat cacggagcaa gcattcttaa acggcaaaag aaaatcacca acttgctcac 1680
gcagtcacgc tgcaccgcgc gaagcgcgc ccgataggcc aagatcgoga gataaaataa 1740
caaccaatga tcataaggaa acaagcccgc gatgtgtcgt gtgcagcaat cttggtcatt 1800
tgcgggatcg agtgcttcac ggctaaccaa atattcggcc gatgatttaa cacattatca 1860
gcgtagatgt acgtacgatt tgtaattaa tctacgagcc ttgctagggc aggtgttctg 1920
ccagccaatc cagatcgccc tcgtatgcac gctcacatga tggcagggca gggttcacat 1980
gagctctaac ggtcgattaa ttaatcccgg ggctcgacta taaatacctc cctaatacca 2040
tgatcaaaac catctcaagc agcctaata tctccagctg atcaagagct ctttaattagc 2100
tagctagtga ttagctgcgc ttgtgatcga tcgatctcgg gtacgtagca cggaccggac 2160
cgaccgtctt cggtagcgc tcaactccgc ctctgccttt gttactgcca cgtttctctg 2220
aatgctctct tgtgtggtga ttgctgagag tggtttagct ggatctagaa ttacactctg 2280

ES 2 769 898 T3

aaatcgtggt ctgcctgtgc tgattacttg ccgtcctttg tagcagcaaa atatagggac 2340
 atggtagtac gaaacgaaga tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taatttgggtg 2400
 cttagcggta tttatttaag cacatgttgg tgttataggg cacttggatt cagaagtttg 2460
 ctgttaattt aggcacaggc ttcatactac atgggtcaat agtatagga ttcattattat 2520
 aggcgatact ataataattt gttcgtctgc agagcttatt atttgccaaa attagatatt 2580
 cctattctgt ttttgtttgt gtgctgttaa attgttaacg cctgaaggaa taaatataaa 2640
 tgacgaaatt ttgatgttta tctctgctcc tttattgtga ccataagtca agatcagatg 2700
 cacttgtttt aaatattgtt gtctgaagaa ataagtactg acagtatttt gatgcattga 2760
 tctgcttggt tgttgtaaca aaatttaaaa ataaagagtt tcctttttgt tgctctcctt 2820
 acctcctgat ggtatctagt atctaccaac tgacactata ttgcttctct ttacatacgt 2880
 atcttgctcg atgccttctc cctagtgttg accagtgtta ctcacatagt ctttgctcat 2940
 ttcattgtaa tgcagatacc aagcgg 2966

<210> 37

<211> 2005

<212> ADN

5 <213> *Zea mays subesp. Mexicana*

<400> 37

gtctggtccc tctctagaga taaagagcat tgcattgcta aagtataaaa aattaccaca 60
 tttttttttg tcacacttat ttgaagtgtg gtttatctat ctctatacat atatttaaac 120
 ttcactctac aaataatata gtctataata ctaaaataat attagtgttt tagaggatca 180
 tataaataaa ctgctagaca tggctctaaag gataattgaa ttttttgaca atctacagtt 240
 ttatcttttt agtgtgcatg tgatctctct gttttttttg caaatagctt gacctatata 300
 atacttcatc cattttatta gtacatccat ttaggattta gggttgatgg tttctataga 360
 ctaattttta gtacatccat tttattcttt ttagtctcta aattttttta aactaaaact 420
 ctatttttagt tttttattta ataatttaga tataaaatga aataaaataa attgactaca 480
 aataaaacaa atacccttta agaaataaaa aactaagca aacatttttc ttgtttcgag 540
 tagataatga caggctgttc aacgccgtcg acgagtctaa cggacaccaa ccagcgaacc 600
 agcagcgtcg cgtcgggcca agcgaagcag acggcacggc atctctgtag ctgcctctgg 660
 acccctctcg agagttccgc tccaccgttg gacttgctcc gctgtcggca tccagaaatt 720
 gcgtggcgga gcggcagacg tgaggcggca cggcaggcgg cctcttcctc ctctcacggc 780
 accggcagct acgggggatt ctttcccac cgctccttcg ctttcccttc ctgcgccgcc 840
 gtaataaata gacaccccct ccacaccctc tttcccacac ctctgtttcg ttcggagcgc 900
 acacacacgc aaccagatct cccccaaatc cagccgtcgg cacctccgct tcaaggtacg 960

ES 2 769 898 T3

ccgctcatcc tcccccccc cctctctcta ccttctctag atcggcgatc cgggccatgg 1020
 ttagggcccg gtagttctac ttctgttcat gtttgtgta gagcaaacat gttcatgttc 1080
 atgtttgtga tgatgtggtc tggttgggcg gtcggttctag atcggagtag gatactgttt 1140
 caagctacct ggtggattta ttaattttgt atctgtatgt gtgtgccata catcttcata 1200
 gttacgagtt taagatgatg gatggaaata tcgatctagg ataggtatac atgttgatgc 1260
 gggttttact gatgcatata cagagatgct ttttttctcg cttggttgtg atgatatggg 1320
 ctggttgggc ggtcgttcta gatcggagta gaatactgtt tcaaactacc tggggattt 1380
 attaaaggat aaagggtcgt tctagatcgg agtagaatac tgtttcaaac tacctgggtg 1440
 atttattaaa ggatctgtat gtatgtgcct acatcttcat agttacgagt ttaagatgat 1500
 ggatggaaat atcgatctag gataggtata catgttgatg cgggttttac tgatgcatat 1560
 acagagatgc ttttttctgc ttggttgtga tgatgtggtc tggttgggcg gtcggttctag 1620
 atcggagtag aatactgttt caaactacct ggtggattta ttaattttgt atctttatgt 1680
 gtgtgccata catcttcata gttacgagtt taagatgatg gatggaaata ttgatctagg 1740
 ataggtatac atgttgatgt gggttttact gatgcatata catgatggca tatgcggcat 1800
 ctattcatat gctctaacct tgagtaccta tctattataa taaacaagta tgttttataa 1860
 ttattttgat cttgatatac ttggatgatg gcatatgcag cagctatatg tggatTTTT 1920
 agccctgcct tcatacgcta tttatttgct tgggtactgtt tcttttgtcc gatgctcacc 1980
 ctggttggg gtgatacttc tgca 2005

<210> 38
 <211> 804
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

5

<400> 38

accgtcttcg gtacgcgctc actccgccct ctgcctttgt tactgccacg tttctctgaa 60
 tgctctcttg tgtggtgatt gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt aactctgaa 120
 atcgtgttct gcctgtgctg attacttgcc gtcctttgta gcagcaaaat ataggacat 180
 ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttgggtgct 240
 tagcggatt tatttaagca catgttggtg ttatagggca cttggattca gaagtttgct 300
 gttaatttag gcacaggctt catactacat ggtcaatag tatagggatt catattatag 360
 gcgatactat aataatttgt tcgtctgcag agcttattat ttgccaaaat tagatattcc 420
 tattctgttt ttgtttgtgt gctgttaaata tgtaaacgcc tgaaggaata aatataaatg 480
 acgaaatTTT gatgtttatc tctgctcctt tattgtgacc ataagtcaag atcagatgca 540

ES 2 769 898 T3

ottgtttttaa atattgttgt ctgaagaaat aagtactgac agtattttga tgcattgatc 600
 tgcttgtttg ttgtaacaaa atttaaaaat aaagagtttc ctttttgttg ctctccttac 660
 ctctgatgg tatctagat ctaccaactg aactatatt gcttctcttt acatacgtat 720
 cttgctcgat gccttctccc tagtgttgac cagtgttact cacatagtct ttgctcattt 780
 cattgtaatg cagataccaa gcgg 804

<210> 39
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> *Agrobacterium tumefaciens*

5

<400> 39

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

<210> 40
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

10

<400> 40

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

15

<210> 41
 <211> 1446
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

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

25

<400> 41

ES 2 769 898 T3

ggtccgattg agacttttca acaaagggta atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60
 ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaaatgc 120

 catcattgcg ataaaggaaa ggccatcggt gaagatgcct ctgccgacag tgggcccaaa 180
 gatggacccc caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca 240
 aagcaagtgg attgatgtga tgggccgatt gagacttttc acaaaggggt aatatccgga 300
 aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag 360
 gaaggtggct cctacaaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420
 tctgccgaca gtgggcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480
 gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg 540
 gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttctt ctatataagg aagttcattt 600
 catttgagaga ggacacgctg acaagctgac tctagcagat ctaccgtctt cggtagcgcg 660
 tcactccgcc ctctgccttt gttactgcca cgtttctctg aatgctctct tgtgtggtga 720
 ttgctgagag tggtttagct ggatctagaa ttacactctg aaatcgtggt ctgcctgtgc 780
 tgattacttg ccgtcctttg tagcagcaaa atatagggac atggtagtac gaaacgaaga 840
 tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taatttggtg cttagcggta tttatttaag 900
 cacatgttgg tgttataggg cacttgatt cagaagtttg ctgtaattt aggcacaggc 960
 ttcatactac atgggtcaat agtatagga ttcataattat aggcgatact ataataattt 1020
 gttcgtctgc agagcttatt atttgcaaaa attagatatt cctattctgt ttttgtttgt 1080
 gtgctgtaa attgttaacg cctgaaggaa taaatataaa tgacgaaatt ttgatgttta 1140
 tctctgctcc tttattgtga ccataagtca agatcagatg cacttgttt aaatattggt 1200
 gtctgaagaa ataagtactg acagtatttt gatgcattga tctgcttggt tgttgtaaca 1260
 aaatttaaaa ataaagagtt tcctttttgt tgctctcctt acctcctgat ggtatctagt 1320
 atctaccaac tgacactata ttgcttctct ttacatacgt atcttgctcg atgccttctc 1380
 cctagtgttg accagtgtta ctacatagt ctttgctcat ttcattgtaa tgcagatacc 1440
 aagcgg 1446

<210> 42
 <211> 1653
 <212> ADN
 <213> *Photinus pyralis*
 <400> 42

5

ES 2 769 898 T3

atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agaggatgga 60
 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tggaacaatt 120
 gcttttacag atgcacatat cgaggtgaac atcacgtacg cggaatactt cgaaatgtcc 180
 gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgtgta 240

 tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtggttg gcgcgttatt tatcggagtt 300
 gcagttgcbc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgaacatt 360
 tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaacgtgcaa 420
 aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaacgga ttaccagga 480
 tttcagtcga tgtacacggt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatacgat 540
 tttgtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcctctgga 600
 tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt cagattctcg 660
 catgccagag atcctatddd tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat ttaagtgtt 720
 gttccattcc atcacggtt tggaatgtt actacactcg gatatttgat atgtggattt 780
 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcaggattac 840
 aaaattcaaa gtgcggtgct agtaccaacc ctatdddcat tcttcgcaa aagcactctg 900
 attgacaaat acgatttata taatttacac gaaattgctt ctgggggcbc acctcttcg 960
 aaagaagtcb ggggaagcgt tgcaaacgc ttccatcttc cagggatagc acaaggatat 1020
 gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg agggggatga taaaccgggc 1080
 gcggtcggta aagttgttcc attdtttgaa gcgaagggtg tggatctgga taccgggaaa 1140
 acgctgggcb ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatgtccggt 1200
 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct 1260
 ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg cttgaagtct 1320
 ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attgttacia 1380
 caccacaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cgtgaaactt 1440
 cccgccgcbg ttgttgtdtt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500
 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcb gaggagttgt gtttgtggac 1560
 gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatcctcata 1620
 aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa 1653

<210> 43
 <211> 936
 <212> ADN
 <213> *Renilla reniformis*

ES 2 769 898 T3

<400> 43

```

atggcttcca aggtgtacga ccccgagcaa cgcaaacgca tgatcactgg gcctcagtgg 60
tgggctcgct gcaagcaaat gaacgtgctg gactccttca tcaactacta tgattccgag 120
aagcacgccg agaacgccgt gatTTTTctg catggtaacg ctgcctccag ctacctgtgg 180
aggcacgtcg tgcctcacat cgagcccgtg gctagatgca tcatccctga tctgatcggg 240

atgggtaagt cgggcaagag cgggaatggc tcatatcgcc tcctggatca ctacaagtac 300
ctcaccgctt ggttcgagct gctgaacctt ccaaagaaaa tcatctttgt gggccacgac 360
tggggggctt gtctggcctt tcaactactcc tacgagcacc aagacaagat caaggccatc 420
gtccatgctg agagtgtcgt ggacgtgatc gagtcctggg acgagtggcc tgacatcgag 480
gaggatatcg ccctgatcaa gagcgaagag ggcgagaaaa tggtgcttga gaataacttc 540
ttcgtcgaga ccatgctccc aagcaagatc atgcggaaac tggagcctga ggagttcgct 600
gcctacctgg agccattcaa ggagaagggc gaggttagac ggctaccct ctctggcct 660
cgcgagatcc ctctcgtaa gggaggcaag cccgacgtcg tccagattgt ccgcaactac 720
aacgcctacc ttcgggccag cgacgatctg cctaagatgt tcatcgagtc cgaccctggg 780
ttcttttcca acgctattgt cgagggagct aagaagttcc ctaacaccga gttcgtgaag 840
gtgaagggcc tccacttcag ccaggaggac gctccagatg aaatgggtaa gtacatcaag 900
agcttcgtgg agcgcgtgct gaagaacgag cagtaa 936

```

5 <210> 44
 <211> 675
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(675)
 <223> Grupo de elementos transcripcionales quiméricos reguladores de la expresión (EXP).

<400> 44

ES 2 769 898 T3

ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
 cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg 120
 ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 180
 agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240
 aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg 300
 gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 360
 aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420
 cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac ccccaccac gaggagcatc gtggaaaaag 480
 aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540
 gggatgacgc acaatcccac tacccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat 600
 ttcatttggg gaggaacat cttccacaca ctcaagccac actattggag aacacacagg 660
 gacaacacac cataa 675

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada de entre el grupo que consiste en:
 - 5 a) una secuencia de ADN con al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17 de longitud completa, en la que la secuencia de ADN tiene la actividad promotora de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15, y 17;
 - b) una secuencia de DNA que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15, y 17;
 - c) un fragmento que comprende al menos 600 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17, en la que el fragmento tiene la actividad promotora de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15, y 17; y
- 10 en la que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula de polinucleótido heteróloga que se puede transcribir.
2. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que la molécula de ADN heteróloga que se puede transcribir comprende un gen de interés agronómico y en la que el gen de interés agronómico transmite tolerancia a los herbicidas o resistencia a las plagas en las plantas.
- 15 3. Una célula vegetal transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada de entre el grupo que consiste en:
 - 20 a) una secuencia de ADN con al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17 de longitud completa, en la que la secuencia de ADN tiene la actividad promotora de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15, y 17;
 - b) una secuencia de DNA que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15, y 17;
 - c) un fragmento que comprende al menos 600 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17, en la que el fragmento tiene la actividad promotora de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15, y 17; y
- en la que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula de polinucleótido heteróloga que se puede transcribir.
- 25 4. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 3, en la que dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal de monocotiledónea o una célula vegetal de dicotiledónea.
5. Una planta transgénica, o parte de la misma, que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada de entre el grupo que consiste en:
 - 30 a) una secuencia de ADN con al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17 de longitud completa, en la que la secuencia de ADN tiene la actividad promotora de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17;
 - b) una secuencia de DNA que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15, y 17;
 - c) un fragmento que comprende al menos 600 nucleótidos contiguos de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15 y 17, en la que el fragmento tiene la actividad promotora de cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 15, y 17; y
- 35 en la que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula de polinucleótido heteróloga que se puede transcribir.
6. Una planta de la progenie de la planta transgénica de la reivindicación 5, o una parte de la misma, en la que la planta de la progenie o parte de la misma comprende dicha molécula de ADN recombinante.
- 40 7. Una semilla transgénica de la planta transgénica de la reivindicación 5, en la que la semilla comprende la molécula de ADN recombinante.
8. Un procedimiento de producción de una planta transgénica que comprende:
 - a) la transformación de una célula vegetal con la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 para producir una célula vegetal transformada; y
 - b) la regeneración de una planta transgénica a partir de la célula vegetal transformada.
- 45 9. La planta transgénica de la reivindicación 5, en la que dicha planta transgénica es una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea.
10. La planta transgénica de la reivindicación 9, en la que
 - 50 (a) dicha planta es una planta monocotiledónea seleccionada de entre el grupo que consiste en Maíz (*Zea mays*), Arroz (*Oryza sativa*), Trigo (*Triticum*), Cebada (*Hordeum vulgare*), Sorgo (*Sorghum spp.*), Mijo, Mijo perla (*Pennisetum glaucum*), Mijo de dedo (*Eleusine coracana*), Mijo común (*Panicum miliaceum*), Moha itálica (*Setaria italica*), Avena (*Avena sativa*), Triticale, Centeno (*Secale cereale*), Poáceas (*Digitaria*), Cebollas (*Allium spp.*), Piñas

(*Ananas spp.*), Césped, Caña de azúcar (*Saccharum spp.*), Palmas (*Arecaceae*), Bambú (*Bambuseae*), Banana (*Musaceae*), la familia de Gengibre (*Zingiberaceae*), Lirios (*Lilium*), Narcisos (*Narcissus*), Iris (*Iris*), Amarillis, Orquídeas (*Orchidaceae*), Cañas, Jacintos (*Hyacinthoides*), y Tulipanes (*Tulipa*); o

5 (b) dicha planta es una planta dicotiledónea seleccionada de entre el grupo que consiste en Soja (*Glycine max*), Soja silvestre (*Glycine soja*), Algodón (*Gossypium*), Tomate (*Solanum lycopersicum*), Pimientas (*Piper*), Calabacines (*Cucurbita*), Guisante (*Pisum sativum*), Alfalfa (*Medicago sativa*), *Medicago truncatula*, Alubias (*Phaseolus*), Garbanzo (*Cicer arietinum*), Girasol (*Helianthus annuus*), Patata (*Solanum tuberosum*), Maní (*Arachis hipogea*), Quinoa, Trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), Algarrobo (*onnia siliqua*), Remolacha (*Beta vulgaris*), Espinaca (*Spinacia oleracea*), y Pepino (*Cucumis sativus*).

10


```

CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CAGCAAGTCGTTGCCACCGGCCAGGGCACCAAGGGCCCTTCCAAGTCGTCAAACCCCTCAC
CR-Ec.uidA-1:1:4 CAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACTAGGGGACTTTGCAAGTGGTGAATCCGGCAC
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTCTGGCAGCCTGGCAGGGGTACCTCTACGAGCTGTGCGTCAACCGCCAAGAGCCAGACT
CR-Ec.uidA-1:1:4 CTCTGGCAACCGGGTGAAGGTTATCTCTATGAACCTGTGCGTCAACAGCCAAAAGCCAGACA
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
GAGTGGACATACCTCTCCGCGTGGCATCAGGAGCGTCTGTCAAGGGCGGAGCAG
GAGTGTATATCTACCGCTTCGCGTGGCATCCGGTCACTGGCAGTGGCAGTGAAGGGCGGAACAG
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
TTCCTCATCAACCACAAGCCTTCTACTTCACTGGTTTCGGCCGCCACGAGGACGGCTGAC
TTCCTGATTAACCACAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCTGTCATGAAGATGGGGAC
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
CTGAGGGCAAGGGTTTCGACAACGTCCTGATGGTCCACGACCACGCTCTGATGGACTGG
TTGCGTGGCAAAAGGATTCGATAACGTCGTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGG
** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * ** ** ** ** ** **
ATCGGTGCCAACAGCTACAGGACCAGTCACTACCCGTACGCTGAGGAGATGCTGGACTGG
ATTGGGCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGG
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * ** ** ** *
GCTGACGAGCACGGTATCGTCGTGATCGACGAGACTGCTGCGGTCTGCTTCAACCTGCT
GCAGATGAACATGGCATCGTGGTGTGATGAAACTGCTGCTGCTGGCTTTAAACCTCTCT
** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **
CTGGGCATTGGTTTCGAGGCTGGGAACAAGCCGAAGGAGCTGTACTCTGAGGAAGCTGTC
TTAGGCATTGGTTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAAAGAAGCTGTACAGCGAAGAGGCAGTC
* ** ** ** ** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **
AACGGCGAGACTCAGCAAGCTCATCTCCAGGCGATTAAAGGAGCTGATTGCCAGGGACAAG
AACGGGAAACTCAGCAAGCGCACTTACAGGCGATTAAAGAGCTGATAGCGCGTGACAAA
** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **
AACCATCCGTCGTGTCGTGATGTTGTTCTATTGGGAATGAGCCGGACACCAGACCGCAAGGG
AACCAACCAAGCGTGGTGTGAGTATTGCCAACGAACCGGATACCCGTCGCAAGGT
** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **
GCGGTGAATACTTCGGCCCGCTGGCGGAGGCGACTCGCAAACTGGACCCCAACCCGTCGA
GCACGGGAATATTTCCGGCCACTGGCGGAAGCAACGGGTAAACTCGACCCGACGCGTCCG
** ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * **

```

FIG. 1b

```

CR-Ec.uida_nno-1:1:1
CR-Ec.uida-1:1:4
ATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGGATACCATCAGCGATCTCTTT
*****
GATGTTCTTGTCAATCGGTACTATGGTGGTATGTTTCAGAGCGGGGATCTTGAGACG
GATGTGCTGTCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAAAAGCGCGGATTTGGAAAACG
*****
GCGGAGAAGGTTCTTGAGAAGGAACTCCTGGCGTGGCAAGAGAAAGCTCCATCAGCCGATC
GCAGAGAAGGTAAGTGGAAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAAACTGCATCAGCCGAT
*****
ATTATCACGGAGTACGGGGTTGACACACTTCCGGGCCCTTACAGTATGTACACAGATATG
ATCATCACCGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACCTCAATGTACACCGACATG
*****
TGGTCGGAGGAATACCAGTGTGCATGGTTGGATATGTACCATCGTGTCTTCGACCCGGTT
TGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCACCGCGTCTTTGATCCGCTC
*****
TCAGCGGTTGTCGGCGAACAAGTCTGGAACCTTCGCAGACTTCGCCACGAGCCAAAGGGATA
AGCGCCGTCGTCGGTGAACAGGTATGGAATTCGCCGATTTGCGACCTCGCAAGGCATA
*****
CTGCGGGTAGGAGGGAACAAGAAGGGAATCTTCACACGGGATCGGAAGCCCAAGTCAGCA
TTGCGCGTTGGCGGTAAACAAGAAAGGGATCTTCACTCCGACCCGCAAAACCGAAAGTCGGCG
*****
GCC TTCCTGTTGCAGAAGCGATGGACAGGAATGAACTTCGGAGAAAAGCCACAGCAAGGC
GCTTTTCTGCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGAAAAACCCGACAGCGGA
*****
GGAAGAAGCAGTGA
GGCAAAACAATGA
*****

```

FIG. 1c