

B.T.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-101616

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

*SECUENCIAS REGULADORAS PARA EXPRESAR PRODUCTOS DE GEN EN UN
TEJIDO REPRODUCTIVO DE PLANTAS.*

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A01H 1/00

71. SOLICITANTE

SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.

DOMICILIO

BASILEA, SUIZA

74. APODERADO

JIMENA ESCOBAR URRIBE

22. BOGOTÁ, D. C.,

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT**

ENTRADA EN FASE NACIONAL

20-11-06

SOLICITUD DE.



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I



Capítulo II

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre **Syngenta Participations AG**
Dirección: **Schwarzwaldallee 215, CH-4058
Basilea**

Nacionalidad o Domicilio: **Basilea, Suiza**
Lugar de Constitución: **Suiza**
Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

CC ☐ NIT ☐

CE ☐ Otro ☐

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre **JIMENA ESCOBAR URIBE**
Dirección **Cra 11A No 94-76 (Of 305)**
Teléfono **6 162051/61** Fax **6 161889**
E-mail **tm-patent@escobaruribe.com**

IDENTIFICACIÓN

CC ☒ NIT ☐

CE ☐ Otro ☐

Número **39 779 452 T P 68 228**

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre **VER ANEXOS**
Dirección: **NUCCIO, Michael, L.
LAGRIMINI, Mark, L.
MAGHJI, Moez**
Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No **PCT/US2005/013245** Fecha **19 de abril de 2005**

Publicación Internacional No **WO 2005/102034 A2** Fecha **3 de noviembre de 2005**

6

TÍTULO (54)

**SECUENCIAS REGULADORAS PARA EXPRESAR PRODUCTOS DE GEN EN UN
TEJIDO REPRODUCTOR DE PLANTAS**

7

Clasificación Internacional (51)

A01H 1/00

8

Priority

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

Estados Unidos de América

(32) Fecha

20 de abril de 2004

20 de abril de 2004

(31) Número de Solicitud

60/563.667

60/563.676

9

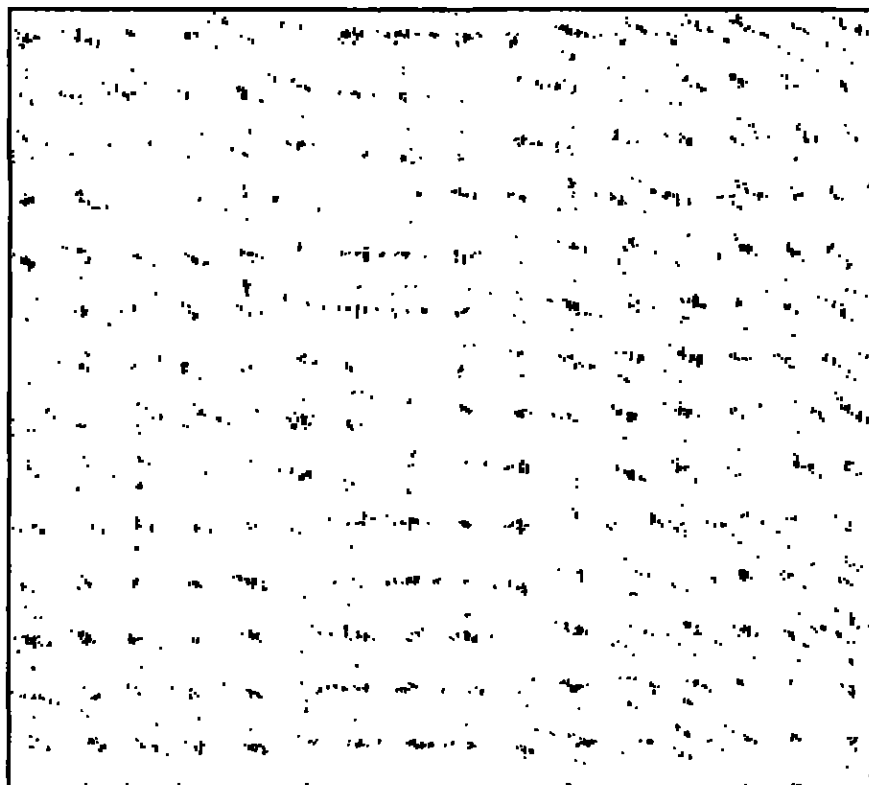
Comprobante de pag No 06 - 75.721

Fecha 2 de octubre de 2006

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud

- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros
- ☐
- ☐

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA:

Jimena

C.C. 39.779.452 de Usaquén T.P. 66.228

3002/PCT

3002

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176009-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 75,721
FECHA : OCTUBRE 2 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-101616- -00000-0000
Fee: 2006-10-09 14:28:35 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEYII
Eve: 379 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 182

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	53371694	02/10/2006	6,345,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. REENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	\$ 463,000.00

BON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXOS

INVENTORES

1.) NUCCIO, Michael, L. .
(3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, Carolina del Norte 27709, Estados Unidos de América);

2.) LAGRIMINI, Mark, L.
(4008, New Yarmouth Way, Apex, Carolina del Norte 27502, Estados Unidos de América);

3.) MEGHJI, Moez
 (14658 East 925 North Road, Bloomington, Illinois 61704, Estados Unidos de América).

4

GENERAL
POWER OF ATTORNEY
DOCUMENTO DE PODER

The undersigned

acting on behalf of and representing
SYNGENTA PARTICIPATIONS AG, a company
incorporated under the law of Switzerland

domiciled at Basel, Switzerland

hereby appoints

**JIMENA ESCOBAR-URIBE and/or IGNACIO
ESCOBAR-URIBE**

domiciled at Bogota, Colombia

CARRERA 11 A No. 94-76 OF 305-306

to act as and legal attorneys with the necessary powers to apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial designs, commercial emblems and marks, trademarks, domain names, copyrights, and other rights, plant varieties, health licenses as well as their assignments, extensions, renewals, changes of name and domicile; 2. to prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind, 3 to intervene as plaintiff or defendants, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public office or authority in any judicial, administrative or police action, such as actions dealing with commercial emblems and names, oppositions against trademark registrations, caducity and nullity actions; recovery actions arising from obtaining and working of license agreements; actions dealing with unfair competition, criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on all sort of industrial property matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to industrial property matters, copyrights and neighbouring rights and obtention of plant varieties rights.

To this effect, we hereby authorize them to file applications, make descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities, to issue the respective releases and, in general to take, before said authorities, pertinent steps to the above-mentioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect our interests, with all other necessary legal facilities, and we hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to our benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on our behalf any action, as well as the faculty of receiving, denesting, transacting, compromising, conciliating, substituting and revoking substitutions, taking notifications and appointing judicial or extra-judicial attorneys.

El suscrito

obrando en nombre y representación de
SYNGENTA PARTICIPATIONS AG,
constituida y organizada según las leyes de
Suiza.

con domicilio en Basilea, Suiza

nombra a

**JIMENA ESCOBAR-URIBE y/o IGNACIO
ESCOBAR-URIBE**

domiciliados en Bogotá, Colombia

CARRERA 11 A No 94-76 OF 305-306

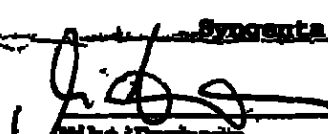
apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente 1 para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, registro de marcas, nombres de dominio, registro de derechos de autor y derechos conexos, registro de variedades vegetales, depósito de nombres comerciales y enseñanzas, registros sanitarios, así como sus traspasos, prórrogas, renovaciones, cambios de nombre y de domicilio, 2 elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clase; 3 intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso, y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas del nombre o enseña comerciales; observaciones u oposición al registro de marcas; acciones de caducidad y nulidad, acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de compensación de daños, demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos u observaciones a cualquier asunto sobre propiedad industrial, el ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad industrial, los derechos de autor y derechos conexos y los derechos de obtentor de variedades vegetales.

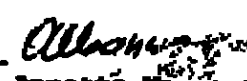
A este efecto, los facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos, pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, recibir toda clase de documentos y valores dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado; y tomar todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses, con todas las demás facultades necesarias y por este documento desde ahora declaramos válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en nuestro beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en nuestro nombre lo actuado, así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, conciliar, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones, tomar posesión de bienes, nombrar apoderados judiciales, sustituirlos y revocarlos.

Signed at **Basel, Switzerland**
on **February 7, 2001**

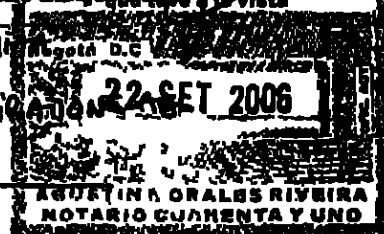
Syngenta Participations AG


Mike Desmarin
Trademark Specialist


Annette Warner
Application Specialist

Firmado en **BASILEA, Suiza**
el **7 FEBRERO, 2001**

SYNGENTA PARTICIPATIONS AG



LEGALIZATION

I, the undersigned Notary Public, residing in Basle (Switzerland), certify as true and authentic the signatures applied on the back of this document by Messrs. Mike Dammann, German citizen, residing in Elmendingen (Germany), and Mrs. Annette Wanner, French citizen, residing in Wentzwiller (France).

These two persons are authorized to represent, the first as Trademark Specialist, the second as Application Specialist the Syngenta Participations AG, a company limited by shares legally domiciled in Basle, with their joint signature by two according to a special power of attorney.

I know the named and their signatures personally.

Basle, this 14th (fourteenth) day of February 2001 (two thousand-one).

Leg. Prot. Nr. 655/2001

Legalization

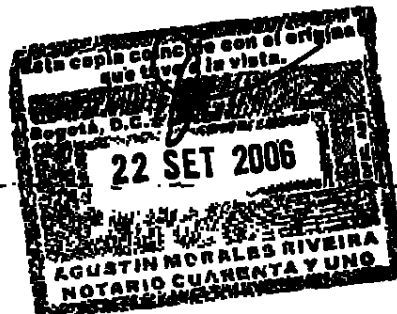
We hereby certify that the signature of Mr.

D. C. K. 1206
notary public in Basle (Switzerland), who is personally known to us, is genuine.

Basle, 15 Feb. 2001
No. 264f

State Chancery of the
Canton of Basle-City

[Signature]
Held. Fleiter





Consulado de Colombia

Berna



AUTENTICACION DE FIRMA No. 0233

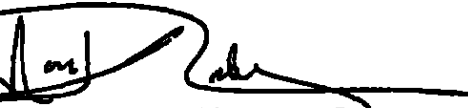
BERNA, 15 DE FEBRERO DEL 2001

El Suscrito Segundo Secretario Encargado
de las funciones consulares de la embajada de la república de
Colombia

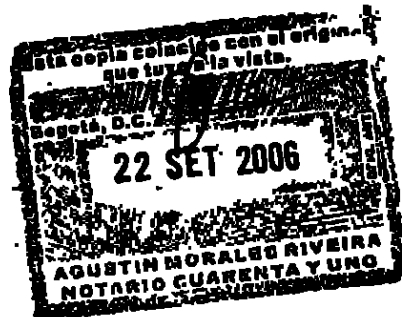
CERTIFICA

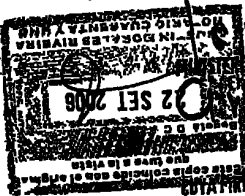
Que la señora **HEIDI FISCHER**, que autoriza el presente documento, ejercía legalmente en la fecha expresada, las funciones de Oficial de la Cancillería de Estado del Cantón de Basilea y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos, son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales, de acuerdo con el registro que se lleva en este Consulado.

El Suscrito Segundo Secretario Encargado de las Funciones Consulares de la Embajada, no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento autenticado.

 
José Ignacio Arbeláez M.

- Pagado Impuesto de Timbre: US\$ 7.00
- Pagado Derechos Consulares: US\$ 15.00





Chel.
Ministerio de Relaciones
Exteriores
416459

ESTA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2008 MAR -8 A 11/50
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

71.
Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 del Ministerio de Justicia, del documento que lleva el sello de legalización No. 416459 de marzo 8 de 2001 y firmado por el Jefe de Legalizaciones en Santafé de Bogotá D.C. (firma ilegible), el cual corresponde a un documento de poder en inglés con su correspondiente traducción al español (razón por la cual no se hace traducción del mismo texto), otorgado por la sociedad SYNGENTA PARTICIPATIONS AG, constituida y organizada según las leyes de Suiza, domiciliada en Basilea, Suiza a Jimena Escobar-Urbe y/o Ignacio Escobar-Urbe y firmado en Basilea, Suiza el 7 de febrero de 2001 por Mike Dammann, Especialista en Marcas y por Annette Wanner, Especialista en Solicitudes.

LEGALIZACIÓN

Yo, el suscrito Notario Público, residente en Basilea (Suiza), certifico como verdaderas y auténticas las firmas inscritas en el reverso de este documento por los señores Mike Dammann, ciudadana alemana, residente en Eimeldingen (Alemania) y la señora Annette Wanner, ciudadana francesa, residente en Wentzwiller (Francia).

Estas dos personas están autorizadas para representar, el primero como Especialista de Marcas, la segunda como Especialista de Solicitudes, a Syngenta Participations AG, una sociedad limitada por acciones legalmente domiciliada en Basilea, con su firma conjunta por dos de acuerdo con un poder especial.

Conozco a las nombradas y a sus firmas personalmente.

Basilea, este 14 (decimocuarto) día de febrero de 2001 (dos mil uno).

(fdo) Firma ilegible
Sello oficial notarial
Conrad Haab I.U.D.
Leg. Prot. 655/2001

Legalización (Sello)

Por medio del presente certificamos que la firma del señor (ilegible) notario público en Basilea (Suiza), quien es personalmente conocido por nosotros, es genuina.

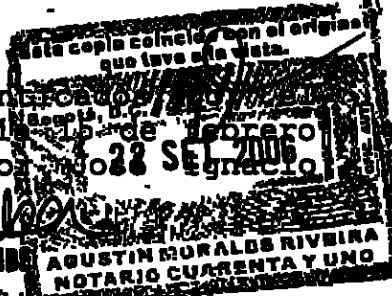
Basilea, 15 de febrero de 2001

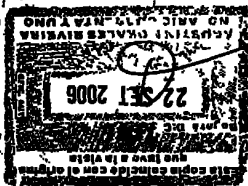
No. 2648

Cancillería de Estado del Cantón de la Ciudad de Basilea (sello oficial).

(fdo) Heidi Fischer

La firma y sello precedentes fueron autenticados por el Consulado de Colombia en Berna, Suiza, el día 15 de febrero de 2001, bajo el número 0233, firmado por Arbeláez M.


JIMENA ESCOBAR URIBE
AGUSTIN MORALES RIVERA
NOTARIO CUARENTA Y UNO
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995



Amencia
SISTEMA DE RELACIONES
EXTERIORES
Seoane
416533

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO N° 154-11-11
LAS CUYAS OPERACIONES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 MAR -8 A H 12

Jefe de Legaciones
SANTO DOMINGO, D.R.

STUDIO

STUDIO

4

Solicito expresamente a nombre de la sociedad
SYNGENTA PARTICIPATIONS AG, sociedad
constituida de conformidad con las leyes de Suiza,
domiciliada en Schwarzwaldallee 215, CH-4058
Basilea, Suiza, el otorgamiento de Patente para la
invención titulada "**SECUENCIAS REGULADORAS
PARA EXPRESAR PRODUCTOS DE GEN EN UN
TEJIDO REPRODUCTOR DE PLANTAS**".

Clase: A01H 1/00


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquen.
T.P. 68.228



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 06-101616 (22) Fecha de solicitud: 09/10/06		(51) Int Cl: A01H 1/00 (71) Solicitante(s): SYNGENTA PARTICIPATIONS AG	
(30) Prioridad Estadinense Estadinense	(31) No. Prioridad 80/583,887 80/583,878	(32) Fecha 20/04/04 20/04/04	(33) País US US
		(72) Inventor(es): NUCCIO, Michael, L. // LAGRIMINI, Mark, L. // MEGHJI, Noez. (74) Agente: JIMENA ESCOBAR URIBE	
(85) Fecha inicio fase nacional: 20/11/06 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: Fecha 19/04/05 No. de solicitud PCT/US2005/013245		(87) Publicación Internacional Fecha: Fecha (dd/mm/aa) 03/11/05 N° publicación: WO 2005/102034 A2	
(54) Título: SECUENCIAS REGULADORAS PARA EXPRESAR PRODUCTOS DE GEN EN UN TEJIDO REPRODUCTOR DE PLANTAS.			

Reivindicación(es):

- 1) Un casete de expresión para expresión de producto de molécula de ácido nucleico en el tejido reproductivo de una planta que comprende:
 - a) un promotor, un primer exón; un primer intrón, de un gen MADS, en donde dicho promotor, primer exón, intrón y segundo exón son la secuencia reguladora 5' de dicho casete de expresión; en donde dicha secuencia reguladora 5' se ha construido por ingeniería para incluir un codón de iniciación transnacional en aproximadamente el extremo 3' de dicha secuencia reguladora 5' y no contiene sitios de endonucleasa de restricción que oculten la manipulación por métodos de ADN recombinantes o codones de iniciación de traducción adicional corriente arriba de dicho codón de iniciación transnacional;
 - b) una secuencia reguladora 3' de un gen MADS; y
 - c) una molécula de ácido nucleico ligada operablemente a dicha secuencia reguladora 5' y dicha secuencia reguladora 3'.

SECUENCIAS REGULADORAS PARA EXPRESAR PRODUCTOS DE GEN EN UN
TEJIDO REPRODUCTOR DE PLANTA

RESUMEN

Los casetes de expresión que originan el control regulador específico de expresión de transgen en plantas, en donde la expresión de los casetes incluye las secuencias reguladoras de la familia del gen MARS para la expresión de productos de gen recombinante en el tejido reproductor de plantas para el propósito de generar plantas tolerantes a estrés abiótico.

**SECUENCIAS REGULADORAS PARA EXPRESAR PRODUCTOS DE GEN EN UN
TEJIDO REPRODUCTOR DE PLANTAS**

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención incluye la expresión de casetes que contienen secuencias reguladoras derivadas de un gen blanco, por ejemplo, las secuencias reguladoras de la familia del gen MADS, para la expresión específica de tejido de productos de gen recombinante en plantas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En biotecnología agrícola las plantas se pueden modificar de acuerdo con las necesidades de uno. Una manera de lograr esto es utilizar técnicas de ingeniería genética moderna. Por ejemplo, al introducir un gen de interés en una planta, la planta puede ser especialmente modificada para expresar un trato fenotípico deseable. Para esto, las plantas son transformadas más comúnmente con un gen heterólogo que comprende una región promotora, una región codificante y una región determinación. Cuando se trabaja con ingeniería genética un gen heterólogo para la expresión de plantas, la elección de un promotor es a menudo un factor crítico. Aunque puede ser deseable expresar ciertos genes constitutivamente, es decir a través de la planta en todos los momentos y la mayoría de los tejidos y órganos, otros genes son más deseablemente expresados solamente en respuesta a los estímulos particulares o confinados a las células o tejidos específicos.

Los promotores consisten de varias regiones que son necesarias para la función completa del promotor. Algunas de estas regiones son modulares, en otras palabras ellas se pueden utilizar en el aislamiento para conferir actividad promotora o ellas se pueden ensamblar con otros elementos para construir nuevos promotores. Las primeras de estas regiones promotoras descansan inmediatamente corriente arriba de la secuencia codificante y forman la "región promotora núcleo" que contiene la secuencia de consenso, normalmente 20-70 pares base e inmediatamente corriente arriba de la secuencia codificante. La región promotora núcleo contiene una caja TATA y a menudo un elemento iniciador así como también el sitio de iniciación. La longitud precisa de la región promotora núcleo no es fija si no que es usualmente bien reconocible. Tal región esta normalmente presente, con alguna variación, en la mayoría de los promotores. Las secuencias base que descansan entre los varios elementos bien caracterizados parecen ser de menor importancia. La región promotora núcleo es a menudo denominada como una región promotora mínima en razón a que esta es funcional sobre si misma para promover el nivel basal de transcripción.

La presencia de la región promotora núcleo define una secuencia por ser un promotor si la región esta ausente, el promotor no es funcional. La región núcleo actúa para atraer la maquinaria de transcripción general al promotor para la iniciación de transcripción. Sin embargo, la región promotora núcleo es insuficiente para suministrar actividad promotora completa. Una serie de secuencias reguladoras, a menudo corriente

arriba del núcleo, constituyen el resto del promotor. Las secuencias reguladoras determinan el nivel de expresión, el patrón espacial y temporal de la expresión y, para un subconjunto de promotores, la expresión bajo las condiciones inductoras (regulación por factores externos tales como la luz, temperatura, químicos y hormonas). Las secuencias reguladoras pueden ser regiones cortas de secuencia de ADN de 6-100 pares base que definen los sitios de unión para los factores transactuantes, tal como los factores de transcripción. Las secuencias reguladoras también pueden ser mejoradotes de las regiones más largas de las secuencias de ADN que pueden actuar desde una distancia de la región promotora núcleo, algunas veces sobre kilobases desde la región núcleo. La actividad de la secuencia reguladora se puede influenciar por factores transactuantes que incluyen la maquinaria de transcripción general, los factores de transcripción y los factores de montaje de cromatina.

Frecuentemente es deseable tener expresión específica de tejido de un gen de interés en una planta. Los promotores específicos de tejido promueven la expresión exclusivamente en un conjunto de tejidos sin la expresión a través de la planta; los promotores preferidos de tejido promueven la expresión en un nivel superior en un subconjunto de tejidos con una expresión significativamente menor del otro tejido de la planta. Por ejemplo, uno puede desear expresar un producto de valor agregado solamente en semilla de maíz pero no en el resto de las plantas. Otro ejemplo es la producción de esterilidad masculina mediante la ablación específica de tejido.

Los promotores específicos de tejido se pueden expresar en tejido específico en un momento o momentos específicos durante el ciclo de crecimiento de la planta. Sin embargo, los niveles de expresión suficientes de los productos de gen especialmente aquellos productos de gen dirigidos a la expresión en tejidos específicos, es difícil de obtener. Iyer M., et al. (2001). Es conocido que la secuencia líder traducida 5' de mRNA, los intrones, y la región no traducida 3' del mRNA efectúan expresión para genes particulares por ejemplo, Sieburth, L. E. and Meyerowitz, E.M. (1997) muestran que la secuencia intragénica parece ser necesaria para la expresión del gen AGAMOUS (AG), un gen de caja MADS de Arabidopsis, en los distintos patrones de expresión del desarrollo temprano y tardío normal de la flor. Larkin J.C., et al. (1993) muestran que la supresión de la región no codificante 3' del gen GLABROUSI (GL1) de Arabidopsis afecta la función GL1. Sin embargo, a la fecha, no se ha logrado identificar unas regiones reguladoras específicas e incorporarlas en una plataforma de suministro de rasgo robusto.

Aspectos importantes de la presente invención están basados en el descubrimiento de que las secuencias de ADN provenientes de la familia del gen MADS son excepcionalmente útiles en el desarrollo de casetes de expresión robusto que expresan genes recombinantes en los tejidos de plantas reproductoras.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención incluye un número de diferentes aspectos que incluyen el control regulador específico de la

expresión de transgen en plantas al identificar las secuencias reguladoras de la familia del gen MADS e incorporar tales secuencias en los casetes de expresión para la expresión de los productos de gen recombinante en el tejido reproductor de plantas.

La presente invención se relaciona con un método para construir casetes de expresión al identificar el gen blanco utilizando la secuencia de cADN relevante para anotar las secuencias de gADN con el propósito de identificar las secuencias reguladoras del gen blanco, e incorporar una o más secuencias reguladoras en un casete de expresión con una molécula de ácido nucleico. Una planta transformada con un casete de expresión de la invención expresa el producto de la molécula de ácido nucleico de una manera que semeja la expresión del gen blanco.

La presente invención se relaciona con el control regulador específico de la expresión de transgen en plantas e incluye poner como blanco la expresión de transgen para desarrollar tejido reproductor en maíz, arroz y otras monocotiledóneas. El uso de los casetes de expresión para la presente invención incluye expresar un transportador de glucosa o sucrosa para incrementar la resistencia al deterioro reproductor. La resistencia al deterioro también se puede incrementar mediante la expresión específica de la flor de un gen de invertasa o una o más de los genes del metabolismo de trehalosa. La invención comprende además mejorar la capacidad de la toma de molécula pequeña por vía de la expresión creciente de transportadores específicos.

DEFINICIONES

Los términos "estructura de lectura abierta" O "ORF" se refiere a la secuencia de aminoácido codificada entre la iniciación de la traducción y los codones de terminación de la secuencia codificante. Los términos "codón de iniciación" y "codón de terminación" se refiere a una unidad de tres nucleótidos adyacentes ("codón") en una secuencia codificante que especifica la iniciación y la terminación de cadena respectivamente de la síntesis de proteína (traducción de mRNA).

El término "tensión abiótica" se refiere a los factores ambientales no vivos tales como congelamiento, la sequía, calor excesivo, altos vientos, etc., que pueden tener efectos dañinos sobre las plantas.

El término "ácido nucleico" se refiere a un polinucleótido de alto peso molecular el cual puede ser de hebra simple o hebra doble, compuesto de monómeros (nucleótidos) que contienen un azúcar, fosfato y una base que es una purina o pirimidina. Un "fragmento de ácido nucleico" es una fracción de una molécula de ácido nucleico dada. En plantas superiores, el ácido desoxiribonucleico (ADN) es el material genético mientras que el ácido ribonucleico (ARN) esta involucrado en la transferencia de información contenida dentro del ADN en las proteínas un "genoma" es el cuerpo completo del material genético contenido en cada una de las células de un organismo. El término "secuencia de nucleótido" se refiere a un polímero de ADN o ARN que puede ser de hebra simple o doble, opcionalmente conteniendo bases de

nucleótidos sintéticos no naturales o alterados capaces de incorporación en los polímeros de ADN o ARN. A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular de esta invención también comprende implícitamente variantes conservadoramente modificadas de estos (por ejemplo sustituciones de codón degenerado) y secuencias complementarias así como también la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, degenerar las sustituciones de codón se puede generar secuencias en las cuales la tercer posición de uno o más de los codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mezclada y/o desoxinosina (Batzer, et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka, et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); and Rossolini, et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). El termino ácido nucleico se utiliza intercambiabilmente con gen, cADN, y mRNA codificado por un gen.

"operablemente ligado" se refiere a la asociación de las secuencias de ácido nucleico sobre un fragmento de ácido nucleico simple de tal forma que la función de uno se afecta por el otro. Por ejemplo, un promotor esta operablemente ligado con unas secuencias codificantes o ARN funcional cuando este es capaz de afectar la expresión de aquella secuencia codificante o ARN funcional (es decir que la secuencia codificante del ARN funcional este bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes en orientación con sentido o contra sentido pueden estar operablemente ligadas a secuencias reguladoras.

"promotor" se refiere a una secuencia de nucleótido, usualmente corriente arriba (5') de su secuencia codificante, que controla la expresión de la secuencia codificante al suministrar el reconocimiento para la ARN polimerasa y los otros factores requeridos para la transcripción adecuada. "secuencias reguladoras promotoras" consisten de elementos corriente arriba próximos y más distantes. Las secuencias reguladoras promotoras influyen la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN, o la traducción de las secuencias codificantes asociadas. Las secuencias reguladoras incluyen mejoradores, promotores, secuencias líderes no traducidas, intrones, y secuencias de señal de poliadenilación. Ellas incluyen secuencias naturales y sintéticas así como también secuencias que pueden ser una combinación de las secuencias sintéticas y naturales. Un "mejorado" es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad promotora y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para mejorar el nivel de la especificidad de tejido de un promotor. Este es capaz de operar tanto en orientaciones (normal o al revés), y es capaz de funcionar aun cuando se mueva corriente arriba o corriente abajo desde el promotor. El significado del termino "promotor" incluye "secuencias reguladoras promotoras".

"transformante primario" y "generación T0" se refiere a las plantas transgénicas que son de la misma generación genética que el tejido que fue inicialmente transformado (es decir no haber ido a través de meiosis y fertilización desde la transformación). "transformante secundario" y las generaciones "T1, T2, T3, etc." se refiere a plantas transgénicas derivadas de transformantes

primarios a través de uno o más ciclos meióticos y de fertilización. Ellos se pueden derivar mediante autofertilización de transformantes primarios o secundarios o cruces de transformantes primarios o secundarios con otras plantas transformadas o no transformadas.

"gen" se refiere al fragmento de ácido nucleico que expresa el mRNA, el ARN funcional, o la proteína específica, que incluye la secuencia reguladora. El término "gen nativo" se refiere a un gen como al encontrado en la naturaleza. El término "gen quimérico" se refiere a cualquier gen que contiene 1) secuencias de ADN que incluyen secuencias reguladoras y codificantes, que no son encontradas juntas en la naturaleza, o 2) secuencias que codifican partes de proteínas no naturalmente unidas, o 3) partes de promotores que no están naturalmente unidos. De acuerdo con esto un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se derivan de diferentes fuentes o comprenden secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente de aquella encontrada en la naturaleza. Un "transgen" se refiere a un gen que se ha introducido en el genoma mediante la transformación y es establemente mantenido. Los transgenes pueden incluir, por ejemplo, genes que son heterólogos u homólogos a los genes de una planta particular a ser transformada. Adicionalmente, los transgenes pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo o genes quiméricos. El término "gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen "extraño" se refiere a un gen no normalmente encontrado en un

organismo huésped sino aquel que es introducido en el organismo por transferencia de gen.

"Casete de expresión" como se utiliza aquí significa una secuencia de ADN capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótido particular en una célula huésped apropiada, que comprende un promotor operablemente ligado a la secuencia de nucleótido de interés que está operablemente ligado a las señales de terminación. Este también comprende típicamente secuencias requeridas para la traducción adecuada de una secuencia de nucleótido. La región codificante usualmente codifica para una proteína de interés pero también puede codificar para un ARN funcional de interés, por ejemplo, ARN contrasentido o un ARN no traducido en la dirección con sentido o contra sentido. El casete de expresión comprende la secuencia de nucleótido de interés puede ser quimérico significando que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes.

"intrón" se refiere a una sección interviniente de ADN la cual ocurre casi exclusivamente dentro del gen eucariótico, pero que no es traducida a una secuencia de aminoácido en el producto de gen. Los intrones son removidos de un mRNA prematura a través de un proceso denominado, empalme que deja los exones sin tocar para formar un mRNA. Para los propósitos de la presente invención, la definición del término "intrón" incluye las modificaciones a la secuencia de nucleótido de un intrón derivado de un gen blanco, siempre y cuando el intrón modificado no reduzca

significativamente la actividad de su secuencia reguladora 5' asociada.

"exón" se refiere a una sección de ADN que lleva la secuencia codificante para una proteína o parte de esta. Los exones son separados al intervenir, secuencias no modificantes (en intrones). Para los propósitos de la presente invención la definición del termino "exón" incluye las modificaciones a la secuencia de nucleótido de un exón derivado de un gen blanco, siempre y cuando el exón modificado no reduzca significativamente la actividad de su secuencia reguladora 5' asociada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras 1A y 1B son representaciones esquemáticas del OsmADS5 cADN y de la anotación del OsmADS5 gADN con la secuencia OsmADS5 cADN.

La figura 2A es una representación esquemática del vector de montaje OsmADS5.

La figura 2B es una representación esquemática del vector binario OsmADS5.

La figura 3 incluye imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la actividad GUS impulsada por OsmADS5 en maíz T1 5 días antes de la polinización en (A) la sección longitudinal de la mazorca (B) las secciones transversales de la mazorca, (C) el nodo de la mazorca (mazorca

removida), (D) el nodo por debajo del nodo de la mazorca, (E) espiquilla (F) hoja y (G) seda.

La figura 4 incluye imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la actividad GUS impulsada por OsMADS5 en maíz T1 después de la polinización en las secciones (A) longitudinal y (B) transversal de tejido de mazorca cosechado un día después de la polinización; y las secciones (C) longitudinal y (D) transversal de tejido de mazorca cosechado dos días después de la polinización.

La figura 5 incluye imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la expresión del GUS impulsada por OsMADS5 en maíz T1 durante la maduración grano en las secciones (A) transversal y (B) longitudinal de un tejido de mazorca cosechado 5 días después de la polinización; en las secciones (C) transversal y (D) longitudinal del tejido de mazorca cosechado 10 días después de la polinización; y las secciones (E) transversal y (F) longitudinal del tejido de mazorca cosechado 20 días después de la polinización.

Las figuras 6A y 6B son representaciones esquemáticas del OsMADS 6 cADN y la anotación del OsMADS6 gADN con la secuencia OsMADS6 cADN.

La figura 7A es una representación del vector de montaje OsMADS6.

La figura 7B es una representación del vector binario OsMADS6.

La figura 8 incluye imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la expresión GUS impulsada por OsMADS6 en tejido vegetativo de maíz T1 en la (A) seda 2 días después de la polinización y (B) disco de hoja, (C) espiguillas y (D, E) sección longitudinal y transversal del nodo de mazorca 8 días antes de la polinización.

La figura 9 incluye imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la expresión GUS impulsada por OsMADS6 en tejido de mazorca de maíz T1 en las secciones (A) longitudinal y (B) transversal de la mazorca en desarrollo 8 días antes de la polinización; y las secciones (C) longitudinal y (D) transversal de la mazorca en desarrollo 2 días después de la polinización.

La figura 10 incluye imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la expresión GUS impulsada por OsMADS6 en tejido de mazorca de maíz T1 en las secciones (A) transversal y (B) longitudinal a 1 día de la polinización y en las secciones (E) transversal y (D) longitudinal 3 días después de la polinización.

La figura 11 incluye fotocopias que muestran la localización histoquímica de la expresión GUS impulsada por OsMADS6 en tejido de mazorca de maíz T1 durante la maduración en las secciones (A) longitudinal y (B) transversal 5 días después de la polinización,

en las secciones (E) longitudinal y (D) transversal 14 días después de la polinización, y en las secciones (E) longitudinal y (F) transversal y (G) Grano 25 días después de la polinización.

La figura 12 es una representación esquemática de la anotación OsmADS8 gADN con la secuencia OsmADS8 cADN.

La figura 13A es una representación esquemática del vector de montaje OsmADS8.

La figura 13B es una representación esquemática del vector binario OsmADS8.

La figura 14 incluye imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la expresión GUS impulsada por OsmADS8 maíz T1 (A) espiguilla (B) preparación de hoja, (E) seda separada de la inflorescencia (D) nodo de mazorca (E) nodo inmediatamente por debajo del nodo de mazorca, (F) sección transversal y (G) sección longitudinal a través de la mazorca en desarrollo desde el tejido tomado alrededor 5 días antes de la polinización.

La figura 15 incluye imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la expresión GUS impulsada por OsmADS8 en el maíz T1 en las secciones (A) transversal y (B) longitudinal a través de la mazorca en desarrollo y (C) inflorescencias teñidas de tejido tomadas 3 días antes de la polinización, y en las secciones (E) transversal y (F) longitudinal a través de las orejas tomadas el día de la

polinización, y las secciones (F) transversal y (G) longitudinal a través de las mazorcas tomadas 1 día después de la polinización y las secciones (H) transversal y (L) longitudinal a través de la mazorca tomada 6 días después de la polinización.

La figura 16 incluye imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la expresión GUS impulsada por OsmADS8 en maíz T1 en las secciones (A) transversal y (B) longitudinal a través de la mazorca en desarrollo tomada 11 días después de la polinización, y las secciones (E) transversal y (D) longitudinal a través de la mazorca en desarrollo tomada 14 días después de la polinización y secciones (E) transversal y (F) longitudinal a través de la mazorca en desarrollo tomados 20 días después de la polinización.

La figura 17 es una representación esquemática de la anotación del OsmADS13 gADN con la secuencia OsmADS13 cADN.

La figura 18 es una representación esquemática del vector de montaje OsmADS13.

La figura 19 es una representación esquemática del vector binario OsmADS13.

La figura 20 incluye imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la actividad GUS impulsada por OsmADS13 en maíz T1 tomado 5 días antes de la polinización en la primer hoja totalmente expandida, la (B) seda; (C) inflorescencias de espiga; (D) sección longitudinal a través de

la mazorca en desarrollo; y (E) sección transversal a través de la mazorca en desarrollo.

La figura 21 incluye imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la actividad GUS impulsada por OsmADS13 en maíz T1 tomado aproximadamente 5 días antes de la polinización en (A) la primer hoja completamente expandida; (B) ceda; (C) inflorescencias de espiga; (D) sección longitudinal a través de la mazorca en desarrollo.

La figura 22 incluye imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la expresión GUS impulsada por OsmADS13 en manos de maíz T1 tomados de las secciones longitudinal de la mazorca en desarrollo aproximadamente 7 días antes de la polinización de (A) hermano # 18 y (B) hermano # 5 y de (C) la sección transversal y (D) la sección longitudinal del hermano # 4 cinco días antes de la polinización.

La figura 23 incluye imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la actividad GUS impulsada por OsmADS13 en mazorca de maíz en maduración cosechadas 4 días después de la polinización (A,B) y cosechadas (C) 6-7 días después de la polinización.

La figura 24 son imágenes escaneadas que muestran la localización histoquímica de la actividad GUS impulsada por OsmADS13 en mazorcas OsmADS13 de maíz en maduración cosechado 21 días después de la polinización.

La figura 25 incluye imágenes escaneadas de semillas T1 provenientes de plantas transformadas con (A) OsmADS5, (B) OsmADS6 (C) OsmADS8 y (D) OsmADS13. La expresión GUS se evaluó mediante localización histoquímica. Las semillas germinaron y crecieron durante 10 días en un cultivo axénico. Las plantas fueron infiltradas en vacío con un reactivo histoquímica e incubadas a 37° C durante 24 horas luego limpiadas con etanol. Existe un ligero tñido en el tejido aéreo en (A), (C) y (D). De otra manera la actividad GUS no se detectaba. La actividad GUS se observó en las raíces.

La figura 26 muestra un alineamiento de las secuencias de proteínas T6PP

La figura 27^a muestra el vector de montaje OsmADS6-OsT6PP.

La figura 27B muestra el vector binario OsmADS6-OsT6PP.

La figura 28 muestra el efecto del transgen OsmADS-T6PP-3 sobre el rendimiento en un estudio por estrés por sequía.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención incluye un método para construir casetes de expresión basados en identificar un gen blanco e incorporarlo en los elementos reguladores modificados de los casetes de expresión del gen blanco seleccionado. Por ejemplo, los elementos reguladores de los genes que son expresados en las raíces, tallos, hojas, o tejidos reproductores que suministran

resistencia a los insectos, tolerancia herbicida, o tolerancia a el estrés abiótico se incorporan en los casetes de expresión para el propósito de producir un evento transgénico en una planta que se semeja cercanamente al perfil de expresión del gen blanco original. Así, el gen blanco puede ser identificado de los datos de expresión del gen.

La presente invención también esta dirigida a los casetes de expresión que incorporan los mecanismos reguladores de los genes blanco de interés para expresar en las plantas los productos de las moléculas de ácido nucleico de interés de manera que se asemejen al perfil de expresión de nociones blanco originales.

La presente invención incluye además los casetes de expresión que incorporan la secuencia reguladoras del gen 5'-MADS para expresar los productos de las moléculas de ácido nucleico en los tejidos reproductores de las plantas, e incluye además los casetes de expresión que incorporan tanto a las secuencias reguladoras MADS 5'-como la 3'.

La presente invención también incluye los casetes de expresión que incorporan las secuencias reguladoras del gen 5'-MADS e incorporan además el exón del gen 5'-MADS.

La presente invención también incluye los casetes de expresión que incorporan las secuencias reguladoras del gen 5'-MADS, y ademas incorporan el exón del gen 5'-MADS, y el intrón del gen 5'-MADS.

La presente invención incluye además los casetes de expresión que incorporan las secuencias reguladoras del gen 5'-MADS, e incorporan además un exón del gen 5'-MADS un intrón del gen 5'-MADS y un segundo exón.

La presente invención también incluye además casetes de expresión que incorporan tanto las secuencias reguladoras MADS 5' como 3', en donde dicha secuencia reguladora 3' incluye una secuencia no traducida 3', y la secuencia no transcrita 3'.

Para los propósitos de esta invención, la definición del término "secuencia no traducida 3'" incluye las modificaciones a la secuencia de nucleótido de una secuencia 3' no traducida modificada no reduzca significativamente la actividad de la secuencia reguladora 3' asociada.

Para los propósitos de esta invención la definición del término "secuencia no traducida 3'" incluye las modificaciones a la secuencia de nucleótido de la secuencia no transcrita 3' derivada de un gen blanco, siempre y cuando la secuencia no transcrita 3' modificada no reduzca significativamente la actividad de la secuencia reguladora 3' asociada. La secuencia no transcrita 3' se extiende aproximadamente 0.5 a 1.5 kb corriente abajo del sitio de determinación de transcripción.

La presente invención también incluye los casetes de expresión que incorporan tanto las secuencias reguladoras MADS 5' como 3', en donde la secuencia reguladora 3' incluye la secuencia

no traducida 3' y la secuencia no transcrita 3' y también puede incluir un intrón de dicho gen MADS.

En general los genes MADS contribuyen al desarrollo de las estructuras reproductoras de las plantas (De Boda et al., 2003), por ejemplo, el gene DoMADS3 expresado específicamente en tejido de pedicelo (Yu and Goh, 2000). Los genes de la familia del gen OsmADS fueron seleccionados para el desarrollo del casete de expresión en razón a que ellos codifican los factores de transcripción MADS que son expresados en flores de arroz jóvenes (Kang and An, 1997). Las proteínas codificadas por los genes de la familia del gen OsmADS son similares al gen DoMADS3 de orquídea (acceso al Gen Bank AF198176). La presente invención reconoce que un método para estabilizar o incrementar el rendimiento en las monocotiledóneas tales como el maíz es incrementar la resistencia al debilitamiento en el tejido reproductor.

Así, los métodos transgénicos para la producción de plantas que tienen una resistencia creciente al decaimiento en el tejido reproductor se beneficiarían del uso de los promotores que resultan en la expresión específica de los tejidos reproductores de las plantas. La presente invención incluye por lo tanto el uso de la secuencia reguladora 5' y 3' del gen OsmADS en los casetes de expresión para apuntar a la expresión de transgen para desarrollar tejidos reproductores. Los genes MADS de los cuales se identificaron las secuencias reguladoras y se utilizaron de acuerdo con la presente invención codifica la siguiente lista de proteínas MADS (tabla 1). Las proteínas MADS se comparan mediante

identidad porcentual y similitud con la proteína codificada por el gen DoMADS3.

TABLA 1

Gen MADS	Proteína completa			Dominio MADS solamente	
	Identidad	similitud	espacios	Identidad	similitud
AB003322	42%	58%	0%	68%	78%
AB003324	59%	74%	3%	80%	95%
AB003328	48%	64%	0%	77%	91%
AF077760	40%	59%	2%	64%	80%
AF095645	40%	61%	5%	64%	90%
AF139664	50%	66%	1%	78%	95%
AF139665	48%	66%	0%	80%	95%
AF141964	40%	60%	11%	66%	86%
AF141965	51%	67%	0%	84%	91%
AY174039	42%	63%	0%	63%	87%
AF204063	60%	72%	3%	91%	98%
AF345911	50%	68%	5%	80%	95%
AF424549	39%	59%	2%	63%	87%
AJ293816	35%	52%	8%	65%	79%
AY115556	39%	61%	1%	60%	85%
AY177695	39%	58%	0%	66%	87%
AY177696	38%	62%	4%	61%	87%
AY177698	41%	61%	3%	68%	87%
AY177699	37%	59%	3%	63%	78%
AY177700	41%	61%	0%	66%	87%
AY177702	38%	59%	5%	70%	89%
AY224482	38%	59%	5%	70%	89%
AY250075	42%	67%	5%	64%	88%
L37527	37%	60%	5%	63%	85%
L37528	45%	68%	1%	84%	94%
U78891	62%	75%	4%	94%	99%
U78782 (OsMADS6)	58%	69%	4%	91%	99%
U78892 (OsMADS8)	60%	73%	6%	94%	99%
U78890 (OsMADS5)	57%	72%	2%	92%	97%
AF151693 (OsMADS13)	46%	67%	1%	84%	94%
AF095646	55%	67%	6%	94%	99%

La presente invención incluye por lo tanto los casetes de expresión para la expresión de un producto de una molécula de ácido nucleico principalmente en el tejido reproductor de una planta que comprende un promotor, un primer exón; un primer intrón, y un segundo exón del gen MADS en donde dicho promotor, primer exón, intrón, y segundo exón son las secuencias reguladoras 5' de dicho casete de expresión; en donde dicha secuencia de reguladora 5' es trabajada con ingeniería para incluir un codón de iniciación, traducción en aproximadamente el extremo 5' de dicha secuencia reguladora 5', y no contenga sitios de endonucleasa de restricción que oculten la manipulación mediante métodos de ADN recombinantes o los codones de iniciación de traducción adicional corriente arriba de dicho codón de iniciación de traducción; una secuencia reguladora 3' del gen MADS que no contenga los sitios de endonucleasa de restricción que oculten la manipulación mediante los métodos de ADN recombinantes, y una molécula de ácido nucleico operablemente ligada a dicha secuencia reguladora 5' y a otra secuencia reguladora 3'.

Los métodos de ADN recombinantes requieren la presencia de los sitios de endonucleasa de restricción específicos en el terminal de las moléculas de ADN para ser unidas. La mayoría de la práctica eficiente requiere los sitios en un complemento de molécula de los sitios en otra molécula. Por ejemplo, un plásmido con un sitio de endonucleasa de restricción SacI Not I es requerido para clonar un gen de interés con los sitios de endonucleasa de restricción como su terminal. Idealmente, estos

sitios son únicos, que ellos no deben ocurrir en cualquier otro lugar en cualquier molécula. Si estos sitios ocurren internamente, ellos ocultan la manipulación mediante los métodos de ADN recombinantes y se deben eliminar. La mutagénesis dirigida de sitio es un método para eliminar también sitios. Las técnicas tales como la digestión parcial seguida por la purificación de gen del fragmento del tamaño adecuado también logrará esto sin eliminar los sitios de endonucleasa de restricción interna, sino que son mucho menos eficientes y por lo tanto menos deseables.

La presente invención reconoce que la síntesis química, que es el uso de tecnología química sintética opuesta la tecnología mediada por encima de una molécula de polinucleótido puede reemplazar o sustituir los métodos de ADN recombinantes de la construcción de una molécula de polinucleótido que comprende unas secuencias de nucleótido específicas.

La presente invención incluye además un método para construir un casete de expresión que comprende las etapas de seleccionar un gen blanco con base en sus datos de expresión o su similitud de proteína codificada a una proteína codificada por otro gen de interés; identificar la estructura de lectura abierta sobre dicho cADN de gen blanco; identificar las posiciones del codón de inicio traslacional, el codón de parada traslacional, el primer intrón, el primer exón, el segundo exón, y la secuencia 3' no traducida y la secuencia 3' no transcrita de dicho gADN de gen blanco al utilizar el cADN para anotar el gADN de gen blanco; incorporarlo en un casete de expresión una secuencia reguladora 5' que comprende dicho promotor, el primer exón, el primer

intrón, y el segundo exón y las secuencia reguladoras 3' que comprende la secuencia no traducida 3' y la secuencia no transcrita 3'; y enlazar operablemente una molécula de ácido nucleico a dicha secuencia reguladora 5' y a la secuencia reguladora 3' de dicho casete de expresión, en donde la molécula de ácido nucleico se expresa de una manera que semeja el perfil de expresión de dicho gen blanco de interés.

Ejemplo 1: Método para construir los casetes de expresión que comprenden las secuencias reguladoras de la familia de gen MADS.

1. Identificar los genes MADS blancos
2. Identificar la secuencia de alta calidad tanto del ADN genómico del blanco (gADN) y cADN.
3. Identificar la estructura de lectura abierta del gen blanco sobre el cADN. En general este está en la estructura de lectura abierta más larga.
4. Utilizar una secuencia de cADN de gen candidato para anotar la secuencia gADN y marcar las posiciones del codón de inicio de traducción, el codón de parada de traducción, los intrones, exones, y el líder no traducido 5' y la secuencia no traducida 3'. Como es conocido en la técnica, marcar el codón de inicio de traducción y el codón de parada de traducción identifica las secuencias reguladoras 5' y la secuencia reguladora 3' del gen. De acuerdo con la presente invención, el promotor puede incluir

una secuencia reguladora promotora, que es la secuencia que se extiende aproximadamente 1.5 a 2.5 kb corriente arriba del codón de inicio de traducción, en donde la secuencia reguladora 3' de la presente invención incluye la secuencia no traducida 3' localizada inmediatamente corriente abajo del codón de parada de traducción y todas las partes de la secuencia no transcrita 3'. Que se extienden 0.5 a 1.5 kb corriente abajo del sitio de terminación de transcripción. En una modalidad de la invención, la secuencia reguladora 5' incluye el promotor, el primer exón, el primer intrón, y el segundo exón.

Solo por vía de ejemplo, las figuras 1A y 1B ilustran la anotación de OsmADS5 gADN con la secuencia OsmADDS5 cADN. Los contigs gADN (AB026295) del GenBank y CL000624.108 (SEQ ID NO 500) más CLO19873.131 (SEQ ID NO 521) se alinearon con las secuencias OsmADS5 cADN (Accesos GenBank U78890). La secuencia de cADN se rompe en los exones correspondientes. Los exones son marcados de acuerdo con los números base cADN. Ambas secuencias se alinean precisamente y las secuencias intervinientes (intrones) son flanqueadas por los límites GT..AG. Los espacios entre los exones representan los intrones. El fragmento AB026295 es una porción de la secuencia de promoción artificial bacterial completo (BAC). El AB026295 (promotor) es un fragmento adicional el BAC que define la secuencia utilizada para promover el desarrollo.

5. Diseñar casetes de expresión que incorporan los siguientes componentes de un gen o genes MADS:

a. El promotor, una secuencia que inicia en el codón de inicio de traducción y se extiende aproximadamente 1.5 a 2.5 kb corriente arriba del codón de inicio de traducción.

b. El primer exón.

c. El primer intrón

d. el primer exón

c. el primer intrón

d. la porción 5'- más del segundo exón

e. El terminal, incluyendo la secuencia 3' no traducida y la secuencia no transcrita 3', que se extiende 0.5 a 1.5 kb corriente abajo del sitio de terminación de la transcripción. El terminal puede incluir un intrón.

Para simplicidad "la secuencia reguladora 5'" de la presente invención incluye los componentes a-d y "la secuencia reguladora 3'" de la presente invención se refiere al componente e.

6. Amplificar la secuencia reguladora 5' del molde gADN apropiado por PCR de alta fidelidad y clonarlo en el vector bacterial adecuado. La secuencia reguladora 5' del ADN genómico del arroz (gADN) se simplifica utilizando PCR de alta fidelidad. Una mezcla de reacción de 50µl contiene 100 ng de gADN de arroz, 200µM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, TTP), 1µL, 20µM cada uno de iniciadores de oligonucleótidos diseñados para amplificar el gADN regulador 5' (Tabla 2), 1µL 10X de amortiguador Expand High Fidelity Y 1 µL de polimerasa de Alta Fidelidad Expand (roche Diagnostics, Cat. No. 1 759 078). El programa de termociclado es de 95°C durante dos minutos luego de 40 ciclos de (94°C durante

15 segundos, 68°C durante 7.5 minutos) seguido por 68°C durante 10 minutos. El producto de gADN regulador 5' es clonado con un kit de clonación de TOPO XL PCR (Invitrogen, Cat, No. K4750-20. El pCR-XL-TOPO-5'-regulador-gADN se identifica al digerir 5 Ml pCR XL-TOPO-5'-regulador-gADN de ADN miniprep (preparado utilizando el procedimiento cuya QIAprep Spin Miniprep de Qiagen, Cat. No. 27106) con EcoRI (New England Biolabs) en una reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA y 2 µl de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X EcoRI (New England Biolabs), La reacción se incuba a 37°C durante 2 horas y los productos pCR-XL-TOPO-5'-regulador-gADN (EcoRI) se resuelven sobre 1% de azarosa TAE. El clon pCR-XL-TOPO-5'-regulador-gADN se secuencia utilizando el kit de secuenciación de ciclo terminador de tinte ABI PRISM (Perkin Elmer).

7. Amplificar la "secuencia reguladora 3'" del molde gADN apropiado mediante PCR de alta fidelidad y clonarlo en un vector bacterial adecuado.

La secuencia reguladora 3' del gADN de arroz se amplifica utilizando el PCR de alta fidelidad. La mezcla de reacción de 50 µL consiste de 100 ng de ADN de arroz, 200 µM de dNTP 1 µL, 20 cada uno de los iniciadores de oligonucleótidos diseñados para amplificar el gADN regulador 3' (Tabla 2), 1 µL 10X de amortiguador Expand High Fidelity Y 1 µL de polimerasa de Alta Fidelidad Expand. El programa de termociclado es de 95°C durante 2 minutos luego de 45 ciclos de (94° durante 15 segundos, 68°C durante 7.5 minutos) seguido por 68°C durante 10 minutos. El producto del gADN regulador 3' es clonado con un kit de clonación

de TOPO XL PCR (Invitrogen, Cat.No. K4750-20) siguiendo las instrucciones del fabricante. El pCR-XL-TOPO-3'-regulador-gADN se identifica al digerir el ADN 5 Ml del ADN miniprep pCR -XL-TOPO-3' regulatory -gADN con EcoRI en 20 µL de reacción que contiene 2 µg BSA y 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X EcoRI. La reacción se incuba a 37°C durante 2 horas y los productos pCR -XL-TOPO-3' reguladora -gADN con (EcoRI) se resuelven sobre 1% de agarosa TAE. El clon pCR -XL-TOPO-3' regulatory -gADN es luego secuenciado.

8. Montar las secuencias negativas 5' y las secuencias reguladoras 3' en un plásmido bacterial.

Los casetes de expresión en la presente invención fueron ensamblados en el vector pNOV6901, también conocido como el "vector de montaje". Este vector contiene la secuencia codificante para el gen reportero GUS (que es irrumpido por un intrón para evitar la expresión bacterial) flanqueado en sus terminales 5' y 3' por sitios de restricción únicos (poliligadores) para facilitar los procedimientos de ADN recombinante. Cualquier número de otros vectores se puede utilizar como es conocido por aquellas personas expertas en la técnica.

9. Incorporar los sitios de restricción en los casetes de expresión, según sea necesario, para facilitar los procedimientos de ADN recombinante.

El codón de de iniciación de la traducción "trabajada por ingeniería", de adelante, es el ATG en el sitio de restricción NcoI (CCATGG). Si existe cualquier tipo de restricción NcoI en la "secuencia reguladora 5' del casete de expresión" ellos se deben eliminar mediante mutagénesis. De manera similar, los sitios de restricción que son utilizados para ensamblar el casete de expresión se deben eliminar mediante mutagénesis. La incorporación del primer intrón en la "secuencia reguladora 5' del casete de expresión" requiere que la secuencia sea modificada para evitar crear fusiones entre la secuencia codificante nativa, que es normalmente traducida en la proteína codificada por el gen blanco, y el "gen de interés" (molécula de ácido nucleico) para ser manejada por el casete de expresión. Este se logra mediante cualquiera de un número de procedimientos mutagénicos que incluyen los procedimientos desarrollados por el kit de mutagénesis Stratagene QuikChange Multi Site-Directed (Cat. No. 200513). Las modificaciones a las secuencias reguladoras 5' al casete de expresión incluyen:

a. modificar el codón de de iniciación de traducción natural del gen blanco de tal forma que la proteína del gen blanco que codifica la secuencia este silente.

b. modificar cualquiera de los codones de iniciación de traducción que existen en la secuencia entre el codón de iniciación de traducción "silenciado" y el codón de iniciación de traducción "trabajado por ingeniería" para asegurar que tales codones no sean operables.

c. modificar cualquiera de los sitios NcoI en la secuencia reguladora 5'.

d. modificar los sitios de endonucleasa de restricción, según sea necesario, para facilitar el montaje de casete de expresión.

En esta modalidad de la invención, el procedimiento no elimina los nucleótidos. Por el contrario, este los modifica para preservar la longitud de la secuencia reguladora 5' en el casete de expresión, silenciando aún la secuencia codificante de proteína del gen candidato. Sin embargo, se contempla que uno o más nucleótidos podrían eliminar para silenciar la expresión de proteína no deseada, siempre y cuando la secuencia reguladora 5' y 3' del casete continúen mejorando la expresión del gen candidato en el tejido reproductor de la planta. Adicionalmente, aquellos expertos en la técnica no consideran irracional alterar la secuencia de los nucleótidos en una molécula de polinucleótido que comprende una secuencia reguladora en tanto que la secuencia reguladora modificada retenga una mayoría de la actividad asociada con la secuencia reguladora original.

La Tabla 2 lista los iniciadores designados para cumplir esta tarea para cada una de las secuencias reguladoras 5' derivadas de la familia del gen MADs. El QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit utiliza cada uno de los clones pCR-XL-TOPO-5'-reguladora-gADN del gen como un molde y los iniciadores listados para mutagénesis que se clonan de acuerdo a la presente invención. Los iniciadores deben contener un 5'-fosfato para

trabajar. Adicionalmente, las alteraciones pueden requerir más de una ronda de mutagénesis. El clon pCR-XL-TOPO-5' reguladora-modificado se secuencia utilizando el kit de secuenciación del ciclo terminador de tinte ABI PRISM (Perkin Elmer).

10. Modificar, en algunos casos, la secuencia reguladora 3' para eliminar los sitios de endonucleasa de restricción para facilitar los procedimientos de ADN recombinantes. El codón de iniciación de traducción "trabajado por ingeniería" es el ATG en el sitio de restricción NcoI (CCATGG). Si existe cualquier sitio de restricción NcoI la "secuencia reguladora 3' casete de expresión" ellos se deben eliminar mediante mutagénesis. De nuevo, este es logrado por cualquiera de un número de procedimientos mutagénicos. La presente invención por lo tanto incluye:

a. modificar cualquiera de los sitios NcoI en la secuencia reguladora 3'.

b. Modificar los sitios de endonucleasa de restricción, según sea necesario, para facilitar el montaje de casete de expresión.

En esta modalidad de la presente invención, el procedimiento no elimina las endonucleasas. En su lugar, este las modifica para preservar la longitud de la secuencia reguladora 3' en el casete de expresión. Sin embargo, se contempla que una o más de los nucleótidos podrían ser eliminados para silenciar la expresión de proteína no deseada, siempre y cuando las secuencias reguladoras 5' y 3' del casete continúen para mejorar la expresión del gen

candidato en el tejido reproductor de la planta. Adicionalmente, aquellos expertos en la técnica no considerarían irrazonable alterar la secuencia de los nucleótidos en una molécula de polinucleótido que comprende una secuencia reguladora en tanto que la secuencia reguladora modificada retenga la mayoría de la actividad asociada con la secuencia reguladora original. La Tabla 2 lista los iniciadores diseñados para lograr esta tarea para cada una de las secuencias reguladoras 3' derivadas de la familia del gen MADs. Cada uno de los clones pCR-XL-TOPO-3'regulador-gADN del gen se utiliza como un molde y los iniciadores listados son utilizados para mutagenizar estos clones. Los clones reguladores pCR-XL-TOPO-3'reguladores modificados son secuenciados.

11. Clonar la secuencia reguladora 3' en el pNOV6901 utilizando PCR con el clon pCR-XL-TOPO-3'reguladora modificado como molde y el conjunto iniciador apropiado descrito en la Tabla 2.

Estos iniciadores son un iniciador 5' oligonucleótido que introduce el sitio de restricción único desde el poliligador terminal 3' GUS en el pNOV6901 y el iniciador 3'-oligonucleótido que introduce el sitio de restricción de corte raro (AscI, PacI, SgfI, RsrII) seguido por un sitio de endonucleasa de restricción único al poliligador de 3'-terminal. En la Tabla 2, estos iniciadores son listados como "iniciadores a la secuencia reguladora 3' del clon en el pNOV6901".

El PCR de alta fidelidad se utiliza para amplificar la secuencia reguladora 3' del clon pCR-XL-TOPO-3'regulador-modificado. Una mezcla de reacción de 50 µL consiste de 1µL de

ADN miniprep, 200 μ M dNTPs, 1 μ L cada uno de 20 μ M de iniciadores de oligonucleótido (Tabla 2) 5 μ L de amortiguador 10X clon PFU y 2.5 unidades de polimerasa de ADN Pfuturbo (Strategene, Cat. No. 600252). El programa de termociclado fue de 95°C durante 30 segundos luego 40 ciclos de (95°C durante 10 segundos, 50°C durante 60 segundos, 72°C durante 6 minutos) luego 72°C durante 10 minutos. El fragmento de ADN de la secuencia reguladora 3' modificada se recupera utilizando el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, Cat. No. 28106). El fragmento de ADN de la secuencia reguladora 3' recuperada se precipita con 20 μ g de glicogen, 0.3 M CH_3COONa (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol a -20°C durante más de 2 horas. El fragmento ADN de la secuencia reguladora 3' se recupera mediante micro centrifugación, lavado con 70% de etanol, secado bajo vacío y resuspendido en 14 μ L ddH₂O. El fragmento de ADN de la secuencia reguladora 3' se digiere en una reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de de BSA, 2 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado y 2 μ L de las endonucleasas de restricción apropiadas. La reacción se incuba a 37°C durante más de 6 horas. Los productos de ADN de la secuencia reguladora 3' digeridos son resueltos sobre 1.0% de agarosa TAE y la banda de la secuencia reguladora 3' apropiada (digerida) se escinde. El ADN de la secuencia reguladora 3' (digerida) se extrae y se recupera utilizando el QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Cat. No. 28704). Donde el ADN de La secuencia reguladora 3' recuperada (digerida) es precipitada con etanol por un vehículo de glicogen. El fragmento de ADN de la secuencia reguladora 3' (digerida) se recupera mediante micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 5 μ L ddH₂O.

2 µg ADN miniprep pNOV6901 se digieren en una mezcla de reacción de 20 µL que contienen 2 µg de BSA, 2 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado (utilizado para generar la secuencia reguladora del gen 3') y 2 µL de la endonucleasa de restricción apropiada (utilizada para generar la secuencia reguladora de gen 3'). La mezcla de reacción se encubó a 37°C durante más de 6 horas, luego a 70°C durante 20 minutos. Luego 1 µL de el amortiguador de nucleasa de restricción 10X apropiado, 1 µL de la fosfatasa alcalina intestinal de becerro 1 unidad/µL (CIP-New England Biolabs) y 8 µL ddH₂O se agregan a la mezcla de reacción y se incuban a 35°C durante 30 minutos. El ADN pNOV6901 (digerido/CIP) se resuelve con 1.0% de agarosa TAE y la banda de 4.7 kb del pNOV6901 (digerido/CIP) se escinde. El ADN pNOV6901 (digerido/CIP) se extrae y se recupera utilizando el kit extracción QIAquick G el (Qiagen, Cat. No. 28704). El ADN pNOV6901 recuperado (digerido/CIP) en etanol se precipita con un vehículo de glicogen. El ADN pNOV6901 (digerido/CIP) se recupera mediante micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, y se seca bajo vacío y se resuspende en 5 µL ddH₂O.

4.0 µL de la secuencia reguladora 3' (digerida) se liga a 4.0 µL de pNOV6901 (digerido/CIP) en una mezcla de ligación de 10 µL que contiene 10 µL de amortiguador de ligasa de ADN 10X T4 y 1 µL de ligasa de ADN T4 (400 unidades/µL-New England Biolabs). La mezcla de ligación se incuba durante más de 8 horas a 16°C. 5.0 µL de la mezcla de ligación se transforma en 50 µL de células competentes Top 10 (Invitrogen, Cat. No. C4040-03). Los recombinantes de la

secuencia reguladora pNOV6901 se verifican al digerir 2 μ L ADN miniprep de la secuencia reguladora pNOV6901-3' con 1 μ L de de la endonucleasa de la restricción apropiada en reacciones de 10 μ L que contienen 1 μ g BSA y 1 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiad. Los digeridos son incubados a 37°C durante 2 horas luego resueltos en 1% de agarosa TAE. Los recombinantes de secuencia reguladora pNOV6901-3' son secuenciados.

12. Clonar las secuencias reguladoras 5' en la secuencia reguladora pNOV6901-3' utilizando PCR con el clon regulador pCR-XL-TOPO-5'-modificado como molde y el iniciador apropiado establecido descrito en la Tabla 2.

Estos iniciadores son un iniciador de oligonucleótido-5' que introduce el mismo sitio de restricción de corte raro utilizado para la secuencia reguladora 3' precedida por una única endonucleasa de restricción en el poliligador terminal 5' del pNOV6901 y el iniciador del oligonucleótido 3' que introduce el sitio NcoI precedido por la secuencia Kozak (CCACCATGG) en el codón de iniciación de traducción "trabajado con ingeniería". La Tabla lista estos iniciadores "iniciadores del clon de la secuencia reguladora 5' en pNOV6901".

El PCR de alta fidelidad se utiliza para amplificar la secuencia reguladora 5' del clon regulador pCR/XL-TOPO-5' modificado. Una mezcla de reacción de 50 μ L consiste de 1 μ L de miniprep ADN, 200 μ M dNTP, 1 μ L cada uno de 200 μ M de iniciadores de oligonucleótido (Tabla 2), 5 μ L 10X de amortiguador PFU Clon y

2.5 unidades de polimerasa de ADN PfuTurbo (Stratagene, Cat. No. 600252). El programa de termociclado fue de 95°C durante 30 segundos y luego 40 ciclos de (95°C durante 10 segundos, 50°C durante 60 segundos, 72°C durante 6 minutos) luego 72°C durante 10 minutos. El fragmento de ADN de la secuencia reguladora amplificada se recupera utilizando un kit de purificación QIAquick PCR. El fragmento de ADN de la secuencia reguladora 5' recuperada es etanol precipitado con un vehículo de glicogen. El Fragmento de ADN de la secuencia reguladora 5' se recupera mediante micro centrifugación, se lava con 70% de etanol. Secado bajo vacío y se resuspende en 14 µL ddH₂O. El fragmento de ADN de la secuencia reguladora 5' se digiere en una reacción de 20µL que contiene 2 µg de BSA, 2 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado y 2 µL de las endonucleasas de restricción apropiadas. La reacción se incuba a 37°C durante más de 6 horas. Los productos de ADN de secuencia reguladora 5' digeridos son resueltos en 1% de agarosa TAE y la banda de la secuencia reguladora 5' apropiada (digerida) se escinde. El ADN de la secuencia reguladora 5' (digerido) se extrae y se recupera utilizando un QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Cat. No. 28704). El ADN de la secuencia reguladora 5' recuperada (digerida) es etanol precipitado con un vehículo de glicogen. El fragmento de ADN de la secuencia reguladora 5' (digerida) se recupera mediante micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende de 5 µL ddH₂O.

2 µg de ADN miniprep de secuencia reguladora pNOV6901-3' se digieren en una reacción de 20 µL que contienen 2 µg de BSA, 2 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado y 2

μL de la endonucleasa de restricción apropiada. La reacción se incuba a 37°C durante más de 6 horas, luego a 70°C durante 20 minutos. Luego 1 μL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 μL 1 unidad/μL CIP Y 8 μl ddH₂O son agregados a reacción y se incuba adicionalmente a 37°C durante 30 minutos. El ADN de la secuencia reguladora pNOV6901-3' (digerido /CIP) se resuelve sobre 1.0% de agarosa TAE y la la banda de la secuencia reguladora pNOV6901-3' (digerida /CIP) se escinde. El ADN de la secuencia reguladora pNOV6901-3' (digerido /CIP) se extrae y se recupera. El ADN de la secuencia reguladora pNOV6901-3' recuperada (digerida/CIP) en etanol se precipita con un vehículo de glicogen. El ADN de la secuencia reguladora pNOV6901-3' (digerido /CIP) se recupera mediante micro centrifugación, se lava con etanol al 70%, se seca bajo vacío y se resuspende en 5μL ddH₂O.

4.0 μL de la secuencia reguladora 5' (digerida) se liga a 4.0 μL de la secuencia reguladora pNOV6901-3' digerido/CIP) en una mezcla de ligación de 10 μL que contiene 1.0 μL de amortiguador de ligasa de ADN 10X T4 y 1 μL de ligasa de ADN T4 (400 unidades/μL). La mezcla de ligación se incuba durante más de 8 horas a 16°C. 5.0 μL de la mezcla de ligación se transforma en 50 μL de celdas componentes Top 10. Los recombinantes de la secuencia reguladora pNOV6901-3'/5' se verifican al digerir 2 μL de ADN miniprep de la secuencia reguladora pNOV6901-3'/5' con 1 μL de la endonucleasa de la restricción apropiada en 10 μL de mezcla de reacción que contienen 1 μg BSA y 1 μL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiada. Los digeridos son incubados a 37°C durante 2 horas luego el ADN de la secuencia

reguladora pNOV6901-3'/5' (digerida) se resuelve en 1% de agarosa TAE. Los recombinantes de la secuencia reguladora pNOV6901-3'/5' positivos se secuencian.

El casete de expresión de la presente invención incluye un reportero de una construcción de reportero GUS en el vector de montaje. Este es flanqueado por el sitio de restricción de corte raro trabajado por Ingeniería. En esta modalidad de la presente invención el gen reportero GUS se puede reemplazar por cualquier gen de interés utilizado en los métodos conocidos por aquellos individuos expertos en la técnica.

13. El casete de expresión se puede ahora movilizar en el vector binario de agrobacterium pNOV6901 al digerir el vector de montaje con la enzima de corte raro y purificar el ADN del casete.

2 µg pNOV6900 se digieren en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2µ de BSA, 2 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado y 2 µL de la endonucleasa de restricción apropiada. La mezcla de reacción se incuba a 37°C durante más de 6 horas, luego a 70°C durante 20 minutos. Luego 1 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 µL 1 unidad/µL CIP y 8 µL ddH₂O se agregan a la reacción y esta se incuba adicionalmente a 37°C durante 30 minutos. 2 µg del ADN miniprep de la secuencia reguladora pNOV6901-3'/5' se digieren en una reacción de 20 µL que contiene 2 µg BSA, 2µl del mismo amortiguador de endonucleasa de restricción 10X utilizado para pNOV6900 Y 2 µL de la misma endonucleasa de restricción utilizada

para pNOV6900. La reacción se incubaba a 37°C durante más de 6 horas.

El ADN del plásmido digerido, pNOV6900 (digerido/CIP) y la secuencia reguladora pNOV6901-3'/5' (digerida) se resuelve sobre 1% de agarosa TAE y el 9.2 kb de pNOV6900 (digerido/CIP) y las bandas de secuencia reguladora pNOV6901-3'/5' apropiadas (digeridas) son escindidas. El pNOV6900 (digerido/CIP) y los ADN de secuencia reguladora pNOV6901-3'/5' (digerido) se extraen y se recuperan. El pNOV6900 recuperado (digerido/CIP) y la secuencia reguladora pNOV6901-3'/5' (y el ADN de la secuencia reguladora pNOV6901-3'/5' (digerido) son precipitados con etanol y glicogen. El pNOV6900 (digerido/CIP) y los fragmentos de ADN de la secuencia reguladora pNOV6901-3'/5' (digerido) recuperan mediante micro centrifugación, se lavan con etanol al 70%, se secan bajo vacío y se resuspenden cada uno en 5 µL de ddH₂O.

4.0 µl pNOV6900 (digerido/CIP) se ligan a 4.0 µL de la secuencia reguladora pNOV6901-3'/5' (digerida) en una mezcla de ligación 10 µL que contiene 1 µL de amortiguador de ligasa 10X T4 ADN y 1 µL de ligasa T4 ADN(400 U/µL). La mezcla de ligación se incubaba durante más de 8 horas a 16°C. 5.0 µL de la mezcla de ligación se transforman en 50 µL de células competentes Top 10. Los recombinantes de la secuencia reguladora pNOV6900- pNOV6901-3'/5' se verifican al digerir 7.5 µL de secuencia reguladora pNOV6900-pNOV6901-3'/5', ADN miniprep con 1.0 µL de NcoI en mezclas de reacción de 10 µL que contienen 1 µg BSA y 1 µL 10X de amortiguador de endonucleasa de restricción 4 (New England

Biolabs). Los digeridos se incuban a 37°C durante 2 horas y luego se resuelve en 1% agarosa TAE. La secuencia de articulación de los recombinantes de secuencia reguladora pNOV6900-pNOV6901-3'/5' se verifican.

14. El casete de expresión pueden se puede transformar ahora en agrobacterium y luego se transforma en plantas de acuerdo con métodos conocidos por aquellas personas expertas en la técnica.

Tabla 2

Iniciadores para construir casetes de expresión que comprenden
secuencia reguladoras de la familia de gen MADS

Objetivo Gen	Iniciadores para secuencia reguladora de clon 5'	
	Nombre	Secuencia
AB003322	AB003322-1 (SEQ. ID No. 133)	5'-CGTTGCCAGCGAGGAGCATGCGTAAAAATC-3'
	AB003322-2 (SEQ. ID No. 134)	5'-GATTCATTTCATCTGTCCAAACAGAAAGGCA-3'
AB003324	AB003324-1 (SEQ. ID No. 145)	5'-TCTAAATAGGGGCCAACATACTCA-3'
	AB003324-2 (SEQ. ID No. 146)	5'-TCAAGCGTCTTAAGCATGCTGAAATATGA-3'
AB003328	AB003328-1 (SEQ. ID No. 158)	5'-AACAAAACCAATAATCTCCAATGCC-3'
	AB003328-2 (SEQ. ID No. 159)	5'-CATCTTCGATCGCCGATGAACCAACC-3'
AB077760	AB077760-1 (SEQ. ID No. 167)	5'-ATTCGTTGGGGGTGACATGACTAGTC-3'
	AB077760-2 (SEQ. ID No. 168)	5'-CAAAGATCCCTTCATGCTGCAGCAG-3'
AB095645	AB095645-1 (SEQ. ID No. 179)	5'-CTCGTGCCGTCGTTGGCTCGGCGT-3'
	AB095645-2 (SEQ. ID No. 180)	5'-CAAGATTCCTGATAGCCTTATACATG-3'
AF139664	AF139664-1 (SEQ. ID No. 193)	5'-TGCATCCTTACAAAGAGACAGATAGATC-3'
	AF139664-2 (SEQ. ID No. 194)	5'-CAAGGATTTTGTCCATCTGTGAAAAATG-3'
AF139665	AF139665-1 (SEQ. ID No. 207)	5'-ACCTGGGGTTTGAAATGGGQAGCG-3'
	AF139665-2 (SEQ. ID No. 208)	5'-CAAGGATCCCTTCATACTACAGAAGAAG-3'
AF141964	AF141964-1 (SEQ. ID No. 218)	5'-AAAACACTGATTAAAGGTTTGTGAAAGGAAAAACACC-3'
	AF141964-2 (SEQ. ID No. 219)	5'-CATAGGTACCTTCAATGCTGAAAAAGAAAACAAGCA-3'
AF141965	AF141965-1 (SEQ. ID No. 232)	5'-TGTTTCTGATTAGGCTACAAGTTAAC-3'
	AF141965-2 (SEQ. ID No. 233)	5'-GATGGTTTCTGTAGGCTCAGAACAG-3'
AF174093	AF174093-1 (SEQ. ID No. 246)	5'-AAAATTCACAAGTATAATTGCTCAC-3'
	AF174093-2 (SEQ. ID No. 247)	5'-GAGCTCCATCAAGCTTAACAAAGCA-3'
AF204063	AF204063-1 (SEQ. ID No. 258)	5'-ACAAATTTGTTGTACCACCTACCTAGGGGT-3'

	AF204063-2 (SEQ. ID No. 259)	5'-CAAGGTTTGTACATGCTGGAAGTGAA-3'
AF345911	AF345911-1 (SEQ. ID No. 271)	5'-GAAAATCTCAAGGTTTCGAAAACGAC-3'
	AF345911-2 (SEQ. ID No. 272)	5'-CAAGGATTTTGTCCATGCTGCAGGGAAAAC-3'
AF424549	AF424549-1 (SEQ. ID No. 283)	5'-TACAAAAGTCTGGAAGTGATAGTATGT-3'
	AF424549-2 (SEQ. ID No. 284)	5'-GATCCCTTGATGCTGCAGCAGGATGCA-3'
AJ293816	AJ293816-1 (SEQ. ID No. 295)	5'-CAAACATTTTAAACTTTAACCATTAAATAG-3'
	AJ293816-2 (SEQ. ID No. 296)	5'-CAATAATCTGTTCATGCTTCATCAATG-3'
AY115556	AY115556-1 (SEQ. ID No. 305)	5'-GATATAAAAACCTACTTTATGTTTCATG-3'
	AY115556-2 (SEQ. ID No. 306)	5'-CAGCTCCTCCATGGTCTGTTCAAAGAAATC-3'
AY177695	AY177695-1 (SEQ. ID No. 316)	5'-TCAGTGCATCATTTTCGTCTACAACTAA-3'
	AY177695-2 (SEQ. ID No. 317)	5'-TATTATTGATTTTCATGCTAACAAAAAG-3'
AY177696	AY177696-1 (SEQ. ID No. 330)	5'-CAAGCAAAGAAACAAATTTCCCAATTAG-3'
	AY177696-2 (SEQ. ID No. 331)	5'-ATAACTGACTTCATGCTGCATATTTGCA-3'
AY177698	AY177698-1 (SEQ. ID No. 342)	5'-AAGATTTGAAGTACTGCTTGTCTTC-3'
	AY177698-2 (SEQ. ID No. 343)	5'-CAAAGATATTTGCAATCCTGCCAAAAAG-3'
AY177699	AY177699-1 (SEQ. ID No. 356)	5'-TCCGGTCCGGCCTGCTCCTCCCGGT-3'
	AY177699-2 (SEQ. ID No. 357)	5'-CAAAGTCCCTCAAGCTGCGCCAAGAAAG-3'
AY177700	AY177700-1 (SEQ. ID No. 366)	5'-ATAAGTATTTCAAGAAAGCTGAAAGTTGA-3'
	AY177700-2 (SEQ. ID No. 367)	5'-CAAGTTATGCATATTTCTTGCAATTTTG-3'
AY177702	AY177702-1 (SEQ. ID No. 379)	5'-TCTTTTCGCAAACTAAACAAGGCCT-3'
	AY177702-2 (SEQ. ID No. 380)	5'-CACAGTTTTCATGCTAGCATGCAAGTAAAG-3'
AY224482	AY224482-1 (SEQ. ID No. 392)	5'-TCTTTTCGCAAACTAAACAAGGCCTTAACA-3'
	AY224482-2 (SEQ. ID No. 393)	5'-TATCACAGTTTTCATGCTAGCATGCAAGT-3'
AY250075	AY250075-1 (SEQ. ID No. 405)	5'-GAAATGTTTTCAATTTGGGACAAATTATTG-3'
	AY250075-2 (SEQ. ID No. 406)	5'-CAAGGATTCGCTGCATACATCAATAAAATATG-3'
L37527	L37527-1 (SEQ. ID No. 419)	5'-GCCAAGAGAGCCCCCTTGCTGCTGGT-3'
	L37527-2 (SEQ. ID No. 420)	5'-CAAGATCCTTGACAGCCTAAAACGCCA-3'
L37528	L37528-1 (SEQ. ID No. 432)	5'-ACCACCTCAATCTCCACTGTTTGATTG-3'
	L37528-2 (SEQ. ID No. 433)	5'-CAGCTCAGATGGTCTGGACACAAAC-3'
U78891	U78891-1 (SEQ. ID No. 443)	5'-TCTTCTTCTTGCTTCATTTGAGTTAATTACA-3'
	U78891-2 (SEQ. ID No. 444)	5'-CAAGCGTTTTAGTCATGCTACAAAGTTC-3'
	AF095646-1 (SEQ. ID No. 508)	5'-TGTTGCATGCATGCGTACTGGTGATGGCCGCA-3'
	AF095646-2 (SEQ. ID No. 509)	5'-AATGTCTTGTATTCTGCAAAACAAAAATAGG-3'

Iniciadores para secuencia reguladora 3' de clon	
Nombre	Secuencia
AB003322-3 (SEQ. ID No. 135)	5'-TAACTGAAAGGAAAAAAAAAAGCATCCTTGC-3'
AB003322-4 (SEQ. ID No. 136)	5'-GAATAAATCTGGCAACTGAAATCCAACCAT-3'
AB003324-3 (SEQ. ID No. 147)	5'-CTAGCTAGCTAGCTACCGTTTCAGCTTC-3'
AB003324-4 (SEQ. ID No. 148)	5'-TGGAGATCGACCACAATTAAATTCT-3'
AB003328-3 (SEQ. ID No. 160)	5'-TAAGTAACAGGOCAGGAATAAGCTGG-3'
AB003328-4 (SEQ. ID No. 161)	5'-ATTGCCGGGCTATAGCCTTTCTCCCT-3'
AB077760-3 (SEQ. ID No. 169)	5'-TGATATATCATCGCGCGCGCGCGCG-3'
AB077760-4 (SEQ. ID No. 170)	5'-CCGTGGTACTGAAATCGAAAAAAGAAATG-3'
AB095645-3 (SEQ. ID No. 181)	5'-TAAGCTGCTAGGTTGCCCCGCCACT-3'
AB095645-4 (SEQ. ID No. 182)	5'-GCACGGCTACCTCTCGCCGAGTACG-3'
AF139664-3 (SEQ. ID No. 195)	5'-TAAGGAGGCTTCAGATCCATACCAG-3'
AF139664-4 (SEQ. ID No. 196)	5'-GGATAAACATTGTGAAGCAACATTTC-3'
AF139665-3 (SEQ. ID No. 209)	5'-TGAAGCATCTGTTGATCTCAAACGTC-3'
AF139665-4 (SEQ. ID No. 210)	5'-ATGAACTOCACCTCGGGAAGTCAGCCT-3'
AF141964-3 (SEQ. ID No. 220)	5'-TGAGCAGGAAGCACAGGTGTCTCT-3'
AF141964-4 (SEQ. ID No. 221)	5'-ATGAGATACAATCTAGTACAACGAAT-3'
AF141965-3 (SEQ. ID No. 234)	5'-TGAAGAAGGOCAGOCACAGCAACAGCTG-3'
AF141965-4 (SEQ. ID No. 235)	5'-CCTTATCGAATATTCAAATCTCGATG-3'
AF174093-3 (SEQ. ID No. 248)	5'-TGACTTCTGGAAGCAGTAGGAAC-3'
AF174093-4 (SEQ. ID No. 249)	5'-CCCCCTCTCTCTCTCCGGGAAGAAG-3'
AF204063-3 (SEQ. ID No. 260)	5'-TGATGTGTGTGTTTCAGTTCAGGCTT-3'
AF204063-4 (SEQ. ID No. 261)	5'-CTGCATATACTTGCAACATTGCAATTTTA-3'
AF345911-3 (SEQ. ID No. 273)	5'-TAAGATGATCATCGTCCGTCGTCTG-3'
AF345911-4 (SEQ. ID No. 274)	5'-TTGACTTAAATGGCAAGATAAATTAGATATA-3'
AF424549-3 (SEQ. ID No. 285)	5'-TGAGATATCATGCGCGCGCGCGCGCGCG-3'
AF424549-4 (SEQ. ID No. 286)	5'-TTTATTATCTTGGCGAGGCCCAAGCACTTTG-3'
AJ293816-3 (SEQ. ID No. 297)	5'-TGATGGCTGGAAAGTAAAGTGAAGGA-3'
AJ293816-4 (SEQ. ID No. 298)	5'-TTTGAAACATTTCCGCCCTGGCTCTCCT-3'
AY115556-3 (SEQ. ID No. 307)	5'-TAACACTAATAATGCCCTGGGGGATAC-3'
AY115556-4 (SEQ. ID No. 308)	5'-AACTTTGCACGAATGATTAAATTGCAT-3'
AY177695-3 (SEQ. ID No. 318)	5'-TAACACATGATCAAGTGTTAAAAACAG-3'
AY177695-4 (SEQ. ID No. 319)	5'-CCCTCGGTCAAACCAGCGTGGTGAGCT-3'

AY177696-3 (SEQ. ID No. 332)	5'-TGACCAGAAAAACATTGTTTTOCTAC-3'
AY177696-4 (SEQ. ID No. 333)	5'-TTTGGGATTGGACTGCATOCCAGGAA-3'
AY177698-3 (SEQ. ID No. 344)	5'-TGATTGCCCTCTTTCCATQCCAATAGG-3'
AY177698-4 (SEQ. ID No. 345)	5'-GTTAACCTAAAAGAAATATTGTTTCAG-3'
AY177699-3 (SEQ. ID No. 358)	5'-TAGAAACAGATGGACGCTTGACGTTCA-3'
AY177699-4 (SEQ. ID No. 359)	5'-AGGCTTGGTGCAAGGATACGAAATCTTG-3'
AY177700-3 (SEQ. ID No. 368)	5'-TAGCCGTCAAAGGACCTTGGTCAATTC-3'
AY177700-4 (SEQ. ID No. 369)	5'-TAATTTTACTAGTACTTTTACTTTGAC-3'
AY177702-3 (SEQ. ID No. 381)	5'-TAAGACTATGCCGTACAAGCTGGACGA-3'
AY177702-4 (SEQ. ID No. 382)	5'-CCGTGGTTGTACACAGAAGACCAATCTATAC-3'
AY224482-3 (SEQ. ID No. 394)	5'-TAAGACTATGCCGTACAAGCTGGACGA-3'
AY224482-4 (SEQ. ID No. 395)	5'-CCGTGGTTGTACACAGAAGACCAATCTATAC-3'
AY250075-3 (SEQ. ID No. 407)	5'-TAGAAGATGTTTCAGATGAAATGGTOCCT-3'
AY250075-4 (SEQ. ID No. 408)	5'-AAAAAATCACC GGCGTCAAATATTTAGGGA-3'
L37527-3 (SEQ. ID No. 421)	5'-TAGGCTGCTGAGCACTGCCAATTTG-3'
L37527-4 (SEQ. ID No. 422)	5'-TGCTGGTGCTCGAGGTGCTGAGCGCG-3'
L37528-3 (SEQ. ID No. 434)	5'-TAGTTTTGGTGTAGACACCCGTACGTAC-3'
L37528-4 (SEQ. ID No. 435)	5'-TGAAAGCTACATTTTAGCCTTGTATTTG-3'
U78891-3 (SEQ. ID No. 445)	5'-TGAACAGTGGGTGCATGAACACCTACATG-3'
U78891-4 (SEQ. ID No. 446)	5'-GATGTTTTTTTTTGTCTTTTGATGCAAGGCC-3'
AP095646-3 (SEQ. ID No. 510)	5'-TGAAGTCCAAGCTTGCTAATAAAAAACGCTG-3'
AP095646-4 (SEQ. ID No. 511)	5'-AAGGGTAGGGCTGCACGAAATGC-3'

Iniciadores para mutagénesis de secuencia reguladora 5'	
Nombre	Secuencia
AB003322-5 (SEQ. ID No. 137)	5'-CCGCGCGGCGCGATCGGCGGGAGAGGCCG-3'
AB003322-6 (SEQ. ID No. 138)	5'-CTTCTGTTGACAGTATCAATGAAATC-3'
AB003322-7 (SEQ. ID No. 139)	5'-ATTTCATCCATCCTACAATTTATTTT-3'
AB003322-8 (SEQ. ID No. 140)	5'-AGAAAGCCGAGGAGGTCTCCGTGCTG-3'
AB003324-5 (SEQ. ID No. 149)	5'-TGGAGCGGGAGATCGAGATCGGCGGAGGCA-3'
AB003324-6 (SEQ. ID No. 150)	5'-AATTCATATTTTCAGCATCCTTAAGAC-3'
AB003324-7 (SEQ. ID No. 151)	5'-ACTGTGCAGATGAGGTGATCGGCTCAT-3'
AB003324-8 (SEQ. ID No. 152)	5'-AGGCCTACGACCTGTCCATCCTCTGCCA-3'
AB003324-9 (SEQ. ID No. 153)	5'-ACGCGTCCGCCCATCGCTGCTAGCTAG-3'
AB077760-5 (SEQ. ID No. 171)	5'-GCTGCAGGGGGCGGCCATCGGGAGGGGCAAGATCGA-3'
AB077760-6 (SEQ. ID No. 172)	5'-CCACCGGGGATCATCAAAGAGGCCAG-3'
AB077760-7 (SEQ. ID No. 173)	5'-TGCCATCATCATCTTCTGCTCCAC-3'
AB077760-8 (SEQ. ID No. 174)	5'-ATGAAGAAGGCCAGGGTGCTCACCCTGCTCT-3'

AB095645-5 (SEQ. ID No. 183)	5'-AGGAGGCGGGATCGGGCGCGGAAAG-3'
AB095645-6 (SEQ. ID No. 184)	5'-GAAACGTGGGCCATCGCCATTGAGCGAAA-3'
AB095645-7 (SEQ. ID No. 185)	5'-TTCTCTTCTTCTTCCATCGGAACTCCT-3'
AB095645-8 (SEQ. ID No. 186)	5'-TGCCGTTTCTGGAGCTGCCCTACTGA-3'
AF139664-5 (SEQ. ID No. 197)	5'-AQAACAAGAGGAAAGAAGGGCGCGGGCAA-3'
AF139664-6 (SEQ. ID No. 198)	5'-TAAGGACCGACTCAAGGTACGTACGTAC-3'
AF139664-7 (SEQ. ID No. 199)	5'-TCATTTTTCACAGTATCGACAAAATCCT-3'
AF139664-8 (SEQ. ID No. 200)	5'-TGGCAGGAAAAGGCATGGCCCAACCCCA-3'
AF139664-9 (SEQ. ID No. 201)	5'-TGCTTTGATTAATACAGCTCGCAGCGAC-3'
AF139665-5 (SEQ. ID No. 211)	5'-CGGCGACGACGATCGGGAGAGGGCGGGT-3'
AF139665-6 (SEQ. ID No. 212)	5'-TCTTCTGTAGTATCGAAGGGATCCTTG-3'
AF139665-7 (SEQ. ID No. 213)	5'-TCGCCGCGCGCGCGCGATGGGCGAGCT-3'
AF141964-5 (SEQ. ID No. 222)	5'-GGGTTTTTCGGGCGGGGAAGGCGCGAGGGGGA-3'
AF141964-6 (SEQ. ID No. 223)	5'-TGAAGTTGTCCATGCTTACTAATACTCAAA-3'
AF141964-7 (SEQ. ID No. 224)	5'-ATTGGTTTTCCCATGCGTGTGATGGATATTC-3'
AF141964-8 (SEQ. ID No. 225)	5'-GACCAAAACCAGCCCATGCTGCATGGTACACTATTAGCT-3'
AF141964-9 (SEQ. ID No. 226)	5'-CCTAATAAGAAACCGATGGGTATAAAATGAGA-3'
AF141965-5 (SEQ. ID No. 236)	5'-GAGAGATCGGGATCGATCGTGGCGGGGA-3'
AF141965-6 (SEQ. ID No. 237)	5'-TCCAAGCGCCGAAAGGCCCTCTCAAGAA-3'
AF141965-7 (SEQ. ID No. 238)	5'-GAAAATGGAGGATGCAGAATATATATCCT-3'
AF141965-8 (SEQ. ID No. 239)	5'-AACAACTGTTCGAAGGAGCATGTCCAC-3'
AF141965-9 (SEQ. ID No. 240)	5'-CTTCTCGCGCGCGCGCGATTTCGGTT-3'
AF141965-10 (SEQ. ID No. 241)	5'-TCTCCCCCGCGCGCGCGCTCTACGA-3'
AF174093-5 (SEQ. ID No. 250)	5'-GGCGAGGTCGGGTTGGGGCAAGGGAA-3'
AF174093-6 (SEQ. ID No. 251)	5'-GAAGATCGAGATCAAGAGGATCGAGGAC-3'
AF174093-7 (SEQ. ID No. 252)	5'-CGTGCTGTTCGAAGCGCAAGTCCGC-3'
AF174093-8 (SEQ. ID No. 253)	5'-AAGAAGGCGAACCAGCTCCCGGTGC-3'
AF204063-5 (SEQ. ID No. 262)	5'-AGGAGGAGGAAGAAGATCGGGAGGGGGA-3'
AF204063-6 (SEQ. ID No. 263)	5'-TCTCCAGCTCATCTTGGTACGTATAGCA-3'
AF204063-7 (SEQ. ID No. 264)	5'-TTCACCTCCAGCATCTACAAAACCTTG-3'
AF204063-8 (SEQ. ID No. 265)	5'-ATCTTCTCCGCGCGCGCGCGCTCTT-3'
AF204063-9 (SEQ. ID No. 266)	5'-GTCCAGCTAGCCAAGGATGGATATATTA-3'
AF345911-5 (SEQ. ID No. 275)	5'-AGCGCGGAGGATCGGGCGGGGGAAGGT-3'
AF345911-6 (SEQ. ID No. 276)	5'-GTTTTCCCTGCAGGATCGACAAAATCCT-3'
AF345911-7 (SEQ. ID No. 277)	5'-CGGCGGCTTCCATCGATTTCAGCTGCT-3'
AF424549-5 (SEQ. ID No. 287)	5'-AGGGGGCGGGGATGGGGAGGGGCAAGAT-3'
AF424549-6 (SEQ. ID No. 287)	5'-CCGCAAGGGGATCATCAAGAAGGCCAG-3'
AF424549-7 (SEQ. ID No. 289)	5'-AGGTGCGCATCATCAAGTTCTCTCCA-3'
AF424549-8 (SEQ. ID No. 290)	5'-TTGCATCTATCATCGTTAAACAAGTC-3'
AJ293816-5 (SEQ. ID No. 299)	5'-TGTGTGATCTGATAAGGCTGCGCGCGCGGT-3'
AJ293816-6 (SEQ. ID No. 300)	5'-TACATTGATGAAGCATCGAACAGATTATTG-3'

AY115536-5 (SEQ. ID No. 309)	5'-CTTATCTTGATCGATCGCGCGAGGCAAG-3'
AY115536-6 (SEQ. ID No. 310)	5'-TGAACAGAACCATCGAGGAGCTG-3'
AY115536-7 (SEQ. ID No. 311)	5'-AGCTCTGATATAGCATGGAGGTTAATTG-3'
AY177695-5 (SEQ. ID No. 320)	5'-TCGATCGATTGAAGAAGGGGAGAGGGA-3'
AY177695-6 (SEQ. ID No. 321)	5'-GACAACACGAAGAACCAGGAGGTGAC-3'
AY177695-7 (SEQ. ID No. 322)	5'-CGCGGCGGGCTGATCAAGAAGGCCCGGAG-3'
AY177695-8 (SEQ. ID No. 323)	5'-CTTTTGTTAGCATCAAATCAATAATA-3'
AY177695-9 (SEQ. ID No. 324)	5'-TGAAGAGCAAACCATCGAGCTAACAAACACA-3'
AY177695-10 (SEQ. ID No. 325)	5'-TCAGGGATGACAACACGATGOCACCATCAGTCAT-3'
AY177696-5 (SEQ. ID No. 334)	5'-TAGCGGCGAAGAAGATCGGGAGGGGGAAGA-3'
AY177696-6 (SEQ. ID No. 335)	5'-GAGGTCCGCTCAAGATCTTCTOCAG-3'
AY177696-7 (SEQ. ID No. 336)	5'-CAAATATGCAACATCAAGTCAGTTAT-3'
AY177696-8 (SEQ. ID No. 337)	5'-CAGCATGGGCCATGCCAGCTCTTCTCT-3'
AY177698-5 (SEQ. ID No. 346)	5'-ACCAACCTGATCAAAAGGGCGTGGGA-3'
AY177698-6 (SEQ. ID No. 347)	5'-TCCAAGAGGAGGATCGGCTCTCAAGAAA-3'
AY177698-7 (SEQ. ID No. 348)	5'-AGGCACTGGCAAGAAGTACGAGTACT-3'
AY177699-5 (SEQ. ID No. 360)	5'-ATCGGCCAGAATCGGAGGGGGGCGCA-3'
AY177700-5 (SEQ. ID No. 370)	5'-AAGAGTGAACAACAAGGTCAGAGGA-3'
AY177700-6 (SEQ. ID No. 371)	5'-GAAAGGTGCAATCCGACGAATAGAG-3'
AY177700-7 (SEQ. ID No. 372)	5'-ATTAGCTACTAAAGGGTGTGTTTCCA-3'
AY177700-8 (SEQ. ID No. 373)	5'-AAAATGCAAGAAATTGTCATAACTTG-3'
AY177702-5 (SEQ. ID No. 382)	5'-GAGAGCGAGGAGATCGGGAGGGGGAAGA-3'
AY177702-6 (SEQ. ID No. 384)	5'-TTACTTGCATCTAGCTTGAAAACGTG-3'
AY177702-7 (SEQ. ID No. 385)	5'-ATCCTAAATTTTCATCGATGGCATCTAG-3'
AY177702-8 (SEQ. ID No. 386)	5'-GATCAAGACCATGCCAGTCTGATGGCCAA-3'
AY177702-9 (SEQ. ID No. 387)	5'-GCACAAGGAAAGCCTTGAACATCTT-3'
AY224482-5 (SEQ. ID No. 396)	5'-GAGAGCGAGGAGATCGGGAGGGGGAAGA-3'
AY224482-6 (SEQ. ID No. 397)	5'-CTTGCATCTAGCTTGAAAACGTGGA-3'
AY224482-7 (SEQ. ID No. 398)	5'-CTAAATTTTCATGCATGGCATCTAG-3'
AY224482-8 (SEQ. ID No. 399)	5'-TGATCAGGACCATCGCAGTCTGATGG-3'
AY224482-9 (SEQ. ID No. 400)	5'-CAAGGAAAGCCAAGGAACATCTTTAC-3'
AY250075-5 (SEQ. ID No. 409)	5'-AGAGAGAGAGATGAAGGGGAAGGGGAA-3'
AY250075-6 (SEQ. ID No. 410)	5'-TATTGATAGTATCGAGCGAATCCTTG-3'
AY250075-7 (SEQ. ID No. 411)	5'-CAGTTGGTTGCCAAGGGCGCTTGGCGA-3'
AY250075-8 (SEQ. ID No. 412)	5'-GAGCCTCGGCATGCCAGCTCCTTCT-3'
AY250075-9 (SEQ. ID No. 413)	5'-CTATTATTTTAAGAAAGCATGGATTATATAG-3'
AY250075-10 (SEQ. ID No. 414)	5'-TGAGACAGACCATGCCTGGGCTAC-3'
L37527-5 (SEQ. ID No. 423)	5'-GAGGAGTTGATATCGGGCGGGCAAGAT-3'
L37527-6 (SEQ. ID No. 424)	5'-ACCTCCATTCCTTGCATGGCGGCT-3'

L37527-7 (SEQ. ID No. 425)	5'-TACTCCACTCCAACGATGGCGTCCAAGT-3'
L37528-5 (SEQ. ID No. 436)	5'-AGCATACCATCCATCTTGAACATGATGGT-3'
L37528-6 (SEQ. ID No. 437)	5'-CATCCATCTTGAACATCTTGGTAAATTCTGGCT-3'
U78891-5 (SEQ. ID No. 447)	5'-AGATCGATCGGGATCGGGAGGGTGGGGT-3'
U78891-6 (SEQ. ID No. 448)	5'-GAACCTTTGTAGCATCACTAAAACGCT-3'
U78891-7 (SEQ. ID No. 449)	5'-GTCCATGAAACAAACCGATGGTAATTGC-3'
AF095646-5 (SEQ. ID No. 512)	5'-CAAAAGTTGAGGGATTGGATCGATCAGA-3'
AF095646-6 (SEQ. ID No. 513)	5'-GATTGGATCGATCAGAGATCGGGAGGGGAAGGGT-3'
AF095646-7 (SEQ. ID No. 514)	5'-GTTTTGTTTCTTCGATGGGATGCGTATTC-3'
AF095646-8 (SEQ. ID No. 515)	5'-GAAGGCGTACGAGGTCTCCGTGCTCTG-3'

Iniciador para mutagénesis de secuencia reguladora 3'	
Nombre	Secuencia
AB003328-5 (SEQ. ID No. 162)	5'-CGTATTGTGCTCCATGCATGCGAAATGCTA-3'
AB095645-9 (SEQ. ID No. 187)	5'-GTAAATTTGCAGATCGATGGATGCTCTCCA-3'
AB095645-10 (SEQ. ID No. 188)	5'-GAACCTCTCCATGCCGTGCACCCCG-3'
AF139664-10 (SEQ. ID No. 202)	5'-ACCTGACCCCGTCCCGTGGCCTGCTGCT-3'
AF141964-10 (SEQ. ID No. 227)	5'-AGAGAAAAGAGTTGCCTTGGCCTCTGGCTCTGC-3'
AF345911-8 (SEQ. ID No. 278)	5'-AGAAGTATTCCAAGGTAATTGTACCAATC-3'
AY177698-8 (SEQ. ID No. 349)	5'-AGGAGGCCAACCTGCATGGCTACGTTCTT-3'
AY177698-9 (SEQ. ID No. 340)	5'-GCTCGTTTGATCCAAGGACAAGATCA-3'
AY177698-10 (SEQ. ID No. 351)	5'-TTCCTAAGGACACGATGGAGTCTGGA-3'
AY177699-6 (SEQ. ID No. 361)	5'-AGTGGCCCCCGGCCCTTTAAGAGCGGCA-3'
AY177700-9 (SEQ. ID No. 374)	5'-TAGGATTTCATAACGATGGACATGTTTC-3'
L37527-8 (SEQ. ID No. 426)	5'-ACGGCAGGGGCCCGTCCGGCAGCTCCGGGA-3'
L37527-9 (SEQ. ID No. 427)	5'-GAACCTCTCCATCGCGCCGCCCGGGGGCT-3'
L37528-7 (SEQ. ID No. 438)	5'-ATGTGAGGACCATCGATTGATGCATTG-3'
U78891-8 (SEQ. ID No. 450)	5'-ACCTACATGCCCGCATGGCTACCATGAT-3'
U78891-9 (SEQ. ID No. 451)	5'-TCGTGTTTTCTCGATGGCCTTGCAT-3'
AF095646-9 (SEQ. ID No. 516)	5'-CCCTTCCTTACCCATCTGCTAACAATATG-3'

Iniciador para clonar secuencia reguladora 3' en pNOV5901	
Nombre	Secuencia
AB003322-9 (SEQ. ID No. 141)	5'-TAATAAGAGCTCTGAAAGGAAAAAAAAAAGCA-3'
AB003322-10 (SEQ. ID No. 142)	5'-ATATATGCGGCCCGCGTCCGAATAAATCTGCCAACTGA-3'
AB003324-10 (SEQ. ID No. 154)	5'-ATATATGCGGCCCGCGTCCGTGGAGATCGAACCAATTAAATTC-3'
AB003324-11 (SEQ. ID No. 155)	5'-TAGGTAGAGCTCCTAGCTAAGCTAGCTACCGTTTCA-3'
AB003328-6 (SEQ. ID No. 163)	5'-TAATAAGAGCTCGTAACAGGCCAAGAAATAAGCT-3'
AB003328-7 (SEQ. ID No. 164)	5'-ATATATGCGGCCCGCGTCCGATTGCCCGGCTATAGCCTT-3'
AB077760-11 (SEQ. ID No. 175)	5'-ATGCATGAGCTCTATATCATCGCCGC-3'
AB077760-12 (SEQ. ID No. 176)	5'-ATATATGCGGCCCGCGTCCGTGGTACTGAAATC-3'
AB095645-13 (SEQ. ID No. 189)	5'-TAATAAGAGCTCGCTGCTAGGTTGCCCGCCCACT-3'
AB095645-14 (SEQ. ID No. 190)	5'-TAATAAGCGCCCGCGTCCGCAAGCTAAGCTCTGCCCGGA-3'
AF139664-11 (SEQ. ID No. 203)	5'-TAATAAGAGCTCGGAGGCTTCAGATCCATAACA-3'
AF139664-12 (SEQ. ID No. 204)	5'-ATATATGCGGCCCGCGTCCGGATAAACATTGTGAAGCAAC-3'
AF139665-8 (SEQ. ID No. 214)	5'-TGATGAGCGCGCCGCAAGCATCTGTTGATCTCA-3'
AF139665-9 (SEQ. ID No. 215)	5'-TATATACTAGTCCCGTCCGATGAAGTCCACCTCCGGAAAC-3'
AF141964-11 (SEQ. ID No. 228)	5'-TGATGAGCGCGCCGCAAGAACACAGGTGT-3'
AF141964-12 (SEQ. ID No. 229)	5'-ATATATCCCGCGCGTCCGATGAGATACAATCTAGTAC-3'
AF141965-11 (SEQ. ID No. 242)	5'-TGATGAGCGCGCCGCAAGAGCCAGCCACA-3'
AF141965-12 (SEQ. ID No. 243)	5'-TATATACCCGCGCGTCCCGCTTATCGAATATTCA-3'
AF174093-10 (SEQ. ID No. 254)	5'-TGATGAGAGCTCCTTCTGGAAGCAGTAC-3'
AF174093-11 (SEQ. ID No. 255)	5'-ATATATGCGGCCCGCGTCCGCGCCCTTCTCCTCCTCCGGGA-3'
AF204063-10 (SEQ. ID No. 267)	5'-TATATACCCGCGCGGTCCCTGCATATACTTGCAACA-3'
AF204063-11 (SEQ. ID No. 268)	5'-TGATGAGCGCGCCGCTGTGTGTGTTCAATTTCAG-3'
AF345911-9 (SEQ. ID No. 279)	5'-TAATAAGCGCGCGGATGATCATCGTGGTGT-3'
AF345911-10 (SEQ. ID No. 280)	5'-TATATACCCGCGCGGTCCGTTGACTTAAATGCCAAG-3'
AF424549-9 (SEQ. ID No. 291)	5'-TGATGAGCGCGCCGCGATATCATCGCCGCG-3'
AF424549-10 (SEQ. ID No. 292)	5'-TATATACCCGCGCGGTCCGTTTATTATCTTGCGGA-3'
AJ293816-7 (SEQ. ID No. 301)	5'-TGATGAGCGCGCCGCTGCTGGAAGTAAAGT-3'
AJ293816-8 (SEQ. ID No. 302)	5'-TATATACCCGCGCGGTCCGTTTGAAGCATTTCGGCCCT-3'
AY115556-8 (SEQ. ID No. 312)	5'-TAATAAGCGCGCCCACTAATAATGCCCTGG-3'
AY115556-9 (SEQ. ID No. 313)	5'-TATATACCCGCGCGGTCCGAAGTTTGCAGGAATG-3'
AY177695-11 (SEQ. ID No. 325)	5'-TAATAAGAGCTCCACATGATCAAGTGTAAAAAC-3'
AY177695-12 (SEQ. ID No. 326)	5'-TATATAGCGGCCCGGTCCGCTCGGTCAAACCAGCOT-3'
AY177696-9 (SEQ. ID No. 338)	5'-TGATGAGAGCTCCCAAAAAACATTGTTTTG-3'

AY177696-10 (SEQ. ID No. 339)	5'-TATATAGCGGCCGCGGTCCGTTTGGGATTGGAC-3'
AY177696-11 (SEQ. ID No. 325)	5'-TGATGAGCGCGCGCTTGCCCTCTTTCCAATC-3'
AY177696-12 (SEQ. ID No. 353)	5'-TATATACCCGGGCGGTCCGTTAACTAAAAAATAAT-3'
AY177699-7 (SEQ. ID No. 362)	5'-TAGTAGGCGGCCGCAACAGATGGACGCTTGA-3'
AY177699-8 (SEQ. ID No. 363)	5'-TATATACCCGGGCGGTCCGAGGCTTGGTGCAAG-3'
AY177700-10 (SEQ. ID No. 375)	5'-TAGTAGGCGGCCGCTCAAAGGACCT-3'
AY177700-11 (SEQ. ID No. 376)	5'-TATATACCCGGGCGGTCCGTAATTTACTAGTACT-3'
AY177702-10 (SEQ. ID No. 388)	5'-TAATAAGAGCTCGACTATGCCGTACAAGC-3'
AY177702-11 (SEQ. ID No. 389)	5'-ATATATGCGGCCGCGGTCCGTTGGTTGTACAG-3'
AY224482-10 (SEQ. ID No. 401)	5'-TAATAAGAGCTCGACTATGCCGTACAAGC-3'
AY224482-11 (SEQ. ID No. 402)	5'-TATATAGCGGCCGCGGTCCGTTGGTTGTACAGA-3'
AY250075-11 (SEQ. ID No. 415)	5'-TAGTAGAGCTCAAGATGTTTCAAGATGAAATG-3'
AY250075-12 (SEQ. ID No. 416)	5'-TATATAGCGGCCGCGGTCCGTAATAAATCACCAGGCT-3'
L37527-10 (SEQ. ID No. 428)	5'-TAGTAGAGCTCGCTGCTGAGCACTGACA-3'
L37527-11 (SEQ. ID No. 429)	5'-TATATAGCGGCCGCGGTCCGTTGGTTGCTCGAAGT-3'
L37528-8 (SEQ. ID No. 439)	5'-TAGTAGAGCTCTTTTGGTTGTAGACACC-3'
L37528-9 (SEQ. ID No. 440)	5'-ATATAGCGGCCGCGGTCCGTTGAAAGCTACATTTAGC-3'
U78891-10 (SEQ. ID No. 452)	5'-TGATGAGCTCACAGTCCGTTGCATGAACA-3'
U78891-11 (SEQ. ID No. 453)	5'-TATATAGCGGCCGCGGTCCGATGTTTTTTTTTGTCTTTTGATGC-3'
AF095646-10 (SEQ. ID No. 517)	5'-ATATATCTCGAGCGGACCGTGTTCATGCATGCGTACTGGTGA-3'
AF095646-11 (SEQ. ID No. 518)	5'-ATATATCCATGGTGGGTTTATTCTGCAACAAAAATAAG-3'

Iniciadores para clonar secuencia reguladora 5' en pNOV6901	
Nombre	Secuencia
AB003322-10 (SEQ. ID No. 142)	5'-TATATACCATGGTGGTQATACTGTCCAACAGGAAG-3'
AB003322-11 (SEQ. ID No. 143)	5'-ATATATGGATCCGACCGTTGCCCAOCCAGGAGCATG-3'
AB003324-12 (SEQ. ID No. 156)	5'-ATATATGGATCCGACCGTCTAAATAGGGCCCAACATAC-3'
AB003324-13 (SEQ. ID No. 157)	5'-TATATACCATGGTGGCTTAAGGATGCTGAAATATGA-3'
AB003328-8 (SEQ. ID No. 165)	5'-TATATAGGATCCGACCGAACAACCAATAATCTCCAATG-3'
AB003328-9 (SEQ. ID No. 166)	5'-TATATACCATGGTGGATCCCGATGAACCAACCAAC-3'
AB077760-9 (SEQ. ID No. 177)	5'-ATATATGTCGACCGACCGATTGTTGGGGTGCATGAC-3'
AB077760-10 (SEQ. ID No. 178)	5'-TACAGTACCATGGTGGCCTTGATGCTGCAGCAGGAT-3'
AB093645-11 (SEQ. ID No. 191)	5'-GAGAGACCTGCAGGCGGACCGCTCGTCCCGTGGTTGGCTCGGCT-3'
AB093645-12 (SEQ. ID No. 192)	5'-ATATATCCATGGTGGTTGATAGCCTTATACATGTCCC-3'

AF139664-13 (SEQ. ID No. 205)	5'-ATATATGGATCCGGACCGTGCACTCTTACAAAGAGACA-3'
AF139664-14 (SEQ. ID No. 206)	5'-TATATACCATGGTGGTGTTCATAGCTGTGAAAAATG-3'
AF139665-10 (SEQ. ID No. 216)	5'-ATATATGTTCGACCGGACCGACCTGGGGTTTGGAAATG-3'
AF139665-11 (SEQ. ID No. 217)	5'-TATATACCATGGTGGCTTCCATACTACAGAAG-3'
AF141964-13 (SEQ. ID No. 230)	5'-ATATATCCTGCAGGCGGACCGAAAAACACTGATTAAAGGT-3'
AF141964-14 (SEQ. ID No. 231)	5'-ATATATCCATGGTGGCCTTCAATGCTGAAAAAGAAAAAC-3'
AF141965-13 (SEQ. ID No. 244)	5'-ATATATGGATCCCGACCGTGTTCGCGATTAGGCTAC-3'
AF141965-14 (SEQ. ID No. 245)	5'-ATATATCCATGGTGGTCTGTAGGCTGCAGAACAGACAC-3'
AF174093-12 (SEQ. ID No. 256)	5'-TATATCCTGCAGGCGGACCGAAAAATTCACAAGTATAATTC-3'
AF174093-13 (SEQ. ID No. 257)	5'-TATATACCATGGTGGTCAAGCTTAACAAAGCAT-3'
AF204063-12 (SEQ. ID No. 269)	5'-TATATAGGATCCCGACCGACAAATTTGTTGTACCAC-3'
AF204063-13 (SEQ. ID No. 270)	5'-ATATATCCATGGTGGTGTACATGCTGGAAGTGA-3'
AF345911-11 (SEQ. ID No. 281)	5'-TATATAGTCGACCGACCGAAAAATCTCAAGGTTTC-3'
AF345911-12 (SEQ. ID No. 282)	5'-TATATACCATGGTGGTGTTCGATCCTGCAGGAA-3'
AF424549-11 (SEQ. ID No. 293)	5'-TATATAGTCGACCGACCGTACAAAGTGCTGGAAGT-3'
AF424549-12 (SEQ. ID No. 294)	5'-TATATACCATGGTGGTGTATGCTGCAGCAGGATOCA-3'
AJ293816-9 (SEQ. ID No. 303)	5'-TATATAGTCGACCGACCGCAAAACATTTTAAACTTTAAC-3'
AJ293816-10 (SEQ. ID No. 304)	5'-TATATACCATGGTGGTGTTCGATGCTTCATCAATGT-3'
AY115556-10 (SEQ. ID No. 314)	5'-TATATACCTGCAGGCGGACCGATATAAAAACTAGTTATG-3'
AY115556-11 (SEQ. ID No. 315)	5'-ATATATCCATGGTGGCGATGGTTCGTTCAAAGAAATC-3'
AY177693-13 (SEQ. ID No. 328)	5'-TATATAGGATCCCGACCGTCAGTCCATCATTTCGTC-3'
AY177693-14 (SEQ. ID No. 329)	5'-TATATACCATGGTGGATTGTATGCTAACAAAAAGG-3'
AY177696-11 (SEQ. ID No. 340)	5'-TATATAGGATCCCGACCGCAAGCAAGAAACAAATTTG-3'
AY177696-12 (SEQ. ID No. 341)	5'-ATATACCATGGTGGCTTGATGCTGCATATTTG-3'
AY177698-13 (SEQ. ID No. 354)	5'-TATATAGGATCCCGACCGAAGATTGAACTACTGCT-3'
AY177698-14 (SEQ. ID No. 355)	5'-TATATACCATGGTGGTTTCAATCCTGCCA-3'
AY177699-9 (SEQ. ID No. 364)	5'-TATATAGGATCCCGACCGTCCGGTCCGCCCTGCTCT-3'
AY177699-10 (SEQ. ID No. 365)	5'-TATATACCATGGTGGCTCACGCTGCCCA-3'
AY177700-12 (SEQ. ID No. 377)	5'-TATATAGGATCCCGACCGATAAGTATTTCAGAAAG-3'
AY177700-13 (SEQ. ID No. 378)	5'-TATATACCATGGTGGGCAAAATTTCTTGCATTTTG-3'
AY177702-12 (SEQ. ID No. 390)	5'-TATATAGTCGACCGACCGTCTTTTCGCAAACTAAAC-3'
AY177702-13 (SEQ. ID No. 391)	5'-TATATACCATGGTGGTCAAGCTAGCATGCAAG-3'
AY224482-12 (SEQ. ID No. 403)	5'-TATATAGTCGACCGACCGTCTTTTCGCAAACTAAACAAGG-3'
AY224482-13 (SEQ. ID No. 404)	5'-TATATACCATGGTGGTTTTCAAAGCTAGC-3'

AY250075-13 (SEQ. ID No. 417)	5'-TATATACCTGCAGCGCGACCGAAATGGTTTCATTTTG-3'
AY250075-14 (SEQ. ID No. 418)	5'-TATATACCATGGTGGCGCTCGATACTATCA-3'
L37527-12 (SEQ. ID No. 430)	5'-TATATACCTGCAGCGCGACCGCCAAGAGAGCCCCCT-3'
L37527-13 (SEQ. ID No. 431)	5'-TATATACCATGGTGGTGGACAGCCTAAAACG-3'
L37528-10 (SEQ. ID No. 441)	5'-TATATAGGATCCGACCGACCGACCTCAATCTCCACT-3'
L37528-11 (SEQ. ID No. 442)	5'-TATATACCATGGTGGATCGGTCTGGACA-3'
U78891-12 (SEQ. ID No. 454)	5'-TATATAGGATCCGACCGCTCTTCTTCTTCCCTTCATTG-3'
U78891-13 (SEQ. ID No. 455)	5'-TATATACCATGGTGGTTAGTGATGCTAGAAAGTTC-3'
AF093646-12 (SEQ ID No. 519)	5'-TATATAGAGCTCAGTCCAAGCTTGCTAATAAAAACGCT-3'
AF093646-13 (SEQ ID No. 520)	5'-TATATACCCGGCGCGTCCGAAGGGTAGGGCTGCACGAA-3'

EJEMPLO 2:

1. Construcción del vector de montaje pNOM6901 que contiene la secuencia de β-glucoronidasa (GUS).

A. preparación de la secuencia de codificación GUS

La secuencia de codificación (GUS) β-glucoronidasa Narasimhulu, et al 1996, Plant Cell, 8: 873-886, que incluyen un intrón construido por ingeniería, se amplifica a partir del pNOV5003 en una reacción de polimerasa Pfuturbo (Stratagene, Cat. No. 600250). La mezcla de reacción consiste de 1 μL de pNOV5003 miniprep ADN 200 μM dNTP, 20 μM GUS5 iniciador de oligonucleótido de 5'atggtacgtcctgtagaaacc-3' (SEQ ID NO 499), 20 μM GUS3 iniciador de oligonucleótido 5'-gatcgagctctcattgtttgcctccctg-3' (SEQ ID NO 499), 5 μL 10X amortiguador Pfu clonado y 2.5 unidades de polimerasa ADN Pfuturbo(Stratagene, Cat. No. 600250) en un volumen final de 50 μL. El programa de termociclización se hizo a 95°C durante 30 segundos luego 10 ciclos de (95°C durante 5 segundos, 55°C durante 10 segundos, 72°C durante 2.5 minutos) luego 20 ciclos de (95°C durante 5 segundos, 57°C durante 15 segundos, 72°C durante 2.5 minutos) luego 72°C durante 2.5

minutos. El producto PCR GUS 2.2 kb se aísla y concentra utilizando el kit QIAEX II (Qiagen, Cat. No. 20021). El El producto PCR GUS se recupera en 15 μ L ddH₂O y se digiere posteriormente en una reacción de 20 μ L que contiene 1 μ g BSA, 2 μ L 10X de amortiguador de endonucleasa de restricción y 1 μ L SacI. La reacción se incuba a 37°C durante 2 horas. El producto PCR GUS (SacI) se redisuelve en 1.5% de agarosa TBE y la banda de producto (SacI) PCR GUS 2.2 kb se corta. El ADN (SacI) de producto PCR GUS se recupera de la agarosa 15 μ L ddH₂O con el kit QIAEX II (Qiagen, Cat. No. 20021).

B. preparación del vector pSP73.

Se prepara ADN miniprep del vector E. coli pSP73 (Promega, Cat. No. P2221). 1 μ L de ADN miniprep se digirió en 20 μ L de mezcla de reacción que contiene 1 μ g de BSA, 2 μ L de endonucleasa de restricción 10X, 1 μ L SmaI y 1 μ L de SacI. La reacción se incubó a 25°C durante 1.5 horas luego 37°C durante 1.5 horas. El ADN pSP73 (SmaI/ SacI) se resolvió sobre 1.5% de agarosa TBE y 2.4 kb de lavanda de pSP73 (SmaI/ SacI) fue escindida. El ADN pSP73 (SmaI/ SacI) se recuperó de la agarosa en 15 μ L de ddH₂O con el kit QIAEX II (Qiagen, Cat. No. 20021).

C. Construcción de pSP73-GUS

5 μ L de Psp73 (SmaI/ SacI) se ligó a 5 μ L del producto GUS PCR (SacI) al mezclar con un volumen igual de la mezcla de ligación de ADN Takara, Versión II (Cat. No. TAK 6022) e incubar a 16°C por 30 minutos. 7.5 μ L de la mezcla de ligación se

transformaron en 50 μ L de células super competentes XL-1 (Stratagene, Cat. No. 200236). Los recombinantes pSP73- GUS se verificaron al digerir 2 μ L de ADN miniprep pSP73- GUS en una reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 μ L de XbaI y 1 μ L SacI y los productos pSP73- GUS (XbaI/ SacI) fueron resueltos sobre 1.5% de agarosa TBE. Los recombinantes pSP73- GUS positivos fueron secuenciados.

D. Adición de sitios de endonucleasa de restricción al pSP73- GUS

A la construcción pSP73- GUS le falta flexibilidad para clonar la secuencia reguladora 3' justo después de la secuencia codificante GUS. Los sitios de restricción adicionales fueron agregados al poli ligador para incrementar la flexibilidad del terminal 3' de la secuencia codificante GUS al ligar un adaptador sintético a la construcción. El adaptador (Synthetic Adapter I) se hizo al combinar 40 μ L de 50 μ M del oligonucleótido PL-F 5'-Pccgcggggcggccgcactagtagtcccggggcccat-3' (SEQ ID NO. 456), 40 μ L de 50 μ M del oligonucleótido PL-R 5'-Pcgatggggcccgggactagtgcgccgcccgcggagct-3' (SEQ ID NO. 457) - donde P es un grupo 5'-fosfato - en 100 μ L de mezcla que es 25 mM en Tris-HCl (pH 8.0) y 10 mM en MgCl₂. La mezcla se hirvió durante 5 minutos, se removió del calor y se enfrió de manera natural a temperatura ambiente (aproximadamente 60 minutos), produciendo una solución de 20 μ M de Synthetic Adapter I.

La construcción pSP73-GUS se preparó al digerir 14 μ L de miniprep pSP73-GUS ADN con 1 μ L de SacI y 1 μ L de ClaI en 20 μ L de mezcla de reacción que contiene 2 μ g de BSA y 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 6 horas, luego a 70°C durante 20 minutos. Entonces 1 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 μ L 1 Unidad/ μ L CIP y 8 μ L de ddH₂O se agregaron a la reacción y ésta se incubó adicionalmente a 37°C durante 30 minutos. El ADN de pSP73-GUS (SacI/ ClaI/CIP) se resolvió en 1% de agarosa TAE, se escindió, se recuperó y el etanol se precipitó con vehículo de glicógeno. El ADN de pSP73-GUS (SacI/ ClaI/CIP) se recuperó mediante micro centrifugación, se lavó con etanol al 70%, se secó bajo vacío y se resuspendió en 5 μ L de ddH₂O.

4.5 μ L de la solución de Synthetic Adapter I se ligó a 2.5 μ L de pSP73-GUS (SacI/ ClaI/CIP) en una mezcla de ligación de 10 μ L que contiene 1 μ L de amortiguador de ligasa 10 X T4 ADN y 1 μ L de ligasa T4 ADN y se incubó más de 8 horas a 16°C. 4 μ L de la mezcla de ligación se transformaron en 50 μ L de células super competentes XL-1 (Stratagene, Cat. No. 200236). Los recombinantes pSP73-GUS-mod fueron verificados al digerir 5 μ L pSP73-GUS-mod miniprep ADN en 20 μ L de reacción que contienen 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 1 μ L de NotI. Los digeridos se resolvieron sobre 1% de agarosa TAE, y la secuencia de los recombinantes pSP73-GUS-mod positivos se verificó. El colon terminado se designó pNOV6901.

2. Construcción del pNOV6900

Fue necesario construir un vector binario de *Agrobacterium* para facilitar la movilización de los casetes de expresión contruidos en pNOV6901 en plantas. El vector pNOV2115 fue modificado al insertar un adaptador que introduce los sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción PacI, SgfI y RsrII. El ADN miniprep pNOV2115 (14 µL) se digirió con 1 µL de KpnI y 1 µL HindIII en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg BSA y 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos fueron incubados a 37°C durante más de 6 horas, luego a 70°C durante 20 minutos. Luego 1 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 µL 1 unidad/µL CIP y 8 µL ddH₂O se agregaron a la reacción y ésta se incubó adicionalmente a 37°C durante 30 minutos. El pNOV2115 (KpnI/HindIII/CIP) se resolvió en 1% de agarosa TAE, 9.2 kb de la banda de ADN del pNOV2115 (KpnI/HindIII/CIP) se escindió, se recuperó y el etanol se precipitó con un vehículo de glicógeno. El ADN pNOV2115 (KpnI/HindIII/CIP) se recuperó mediante micro centrifugación, se lavó con etanol a 70%, se secó bajo vacío y se resuspendió en 5 µL de ddH₂O.

Los sitios de restricción adicionales se agregaron al pNOV2115 (KpnI/HindIII/CIP) al ligar el vector al Synthetic Adapter II. El Synthetic Adapter I I fue hecho al combinar 37 µL de 150 µM de oligonucleótido PL1 5'-Pgtaccggaccgcatcgcttaatta-3' (SEQ ID NO. 458), 37 µL de 150 µM de oligonucleótido PL2 5'-Pagcttaattaagcgatcgcggtccg-3' (SEQ ID NO. 459) - donde P es el grupo de 5'-fosfato - en una mezcla de 100 µL que es 25mM de Tris-HCl (pH 8.0) y 10 mM en MgCl₂. La mezcla se hirvió durante 5

minutos, se removió del calor y se enfrió naturalmente a temperatura ambiente (aproximadamente 60 minutos), produciendo 55 μ M de una solución de Synthetic Adapter II.

2.5 μ L de pNOV2115 (KpnI/ HindIII/CIP) se ligó a 2.5 μ L de 55 μ M de una solución de Synthetic Adapter II al mezclar con un volumen igual de una mezcla de ligación de ADN Takara, Versión II (Cat. No. TAK 6022), y se incubó a 16 °C durante 30 minutos. 5.0 μ L de la mezcla de ligación se transformó en 50 μ L de células competentes DH5 α (Invitrogen, Cat. No. 18258-012). Los recombinantes pNOV2115-mod se verificaron al digerir 2 μ L de ADN miniprep pNOV2115-mod con KpnI, HindIII, PacI o RsrII en reacciones de 10 μ L que contienen 1 μ g de BSA y 1 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. La secuencia de los recombinantes pNOV2115-mod se verificó. El colon terminado se designó pNOV6900.

Ejemplo 3: Construcción del Casete de Expresión OsMADS5

A. Clonación de la secuencia reguladora 5' del OsMADS5

PCR de alta fidelidad se utilizó para amplificar la secuencia reguladora 5' del OsMADS5 proveniente del ADN genómico del arroz (gADN). La mezcla de reacción de 50 μ L consistió de 100 ng de gADN de arroz, 200 μ M de dNTP, 1 μ L 20 μ M del iniciador de oligonucleótido OsMADS5-P3 5'-tgagcaggtagccggcgaccaatcgcgag-3' (SEQ ID NO. 460), 1 μ L 20 μ M del iniciador de oligonucleótido OsMADS#5-P2 5'-catactgttacaaaaaagaaaatcagtggaccac-3' (SEQ ID NO. 461), 1 μ L de amortiguador de Alta Fidelidad Expnd 10X y 1 μ L de

polimerasa de Alta Fidelidad Expand. El programa de termo ciclado fue a 95°C durante 2 minutos seguido por 40 ciclos de (94°C durante 15 segundos, 68°C durante 7.5 minutos) seguido por 68°C durante 10 minutos. El producto de 5.4 kb de ADN, que codifica la secuencia reguladora 5' del OsmADS5, se clonó con el kit de clonación TOPO XL PCR. Los recombinantes del pCR-XL-TOPO-OsmADS5-5'-gADN, que contienen la secuencia reguladora 5' del OsmADS5, se identificaron al digerir 5 µL del ADN miniprep pCR-XL-TOPO-OsmADS5-5'-gADN con EcoRI en 20 µL de mezcla de reacción que contiene 2 µg de BSA y 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 2 horas, luego los productos pCR-XL-TOPO-OsmADS5-5'-gADN (EcoRI) se resolvieron sobre 1% de agarosa TAE. Se secuenciaron los clones de pCR-XL-TOPO-OsmADS5-5'-gADN positivo.

B. Clonación de la secuencia reguladora 3' del OsmADS5

PCR de alta fidelidad se utilizó para amplificar la secuencia reguladora 3' del OsmADS5 del ADN genómico del arroz (gADN). La mezcla de reacción de 50 µL consistió de 100ng de gADN de arroz, 200 µM de dNTP, 1 µL 20 µM de iniciador de oligonucleótido OsmADS#5-T1 5' atgaattgcttatcacattaatggacatc-3' (SEQ ID No. 462) 1 µL 20 µM de iniciador de oligonucleótido OsmADS#5-T2 5'-caaaactacatcaagagccttggaattggtcc-3' (SEQ ID No. 463), 1 µL de amortiguador de Alta Fidelidad Expnd 10X y 1 µL de polimerasa de Alta Fidelidad Expand. El programa de termo ciclado fue de 95°C durante 2 minutos seguido por 40 ciclos de (94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos, 68°C durante 6 minutos) seguido por 68°C durante 15 minutos. Los 1.2 kb del

producto de ADN OsmADS5-3'-gADN, que codifica la secuencia reguladora 3' del OsmADS5, se clonaron con el kit de clonación Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen, Cat. No. K2875-20). Los recombinantes del pCR-BluntII-TOPO-OsmADS5-3'-gADN, con la secuencia reguladora 3' OsmADS5 se identificaron al digerir 5 µL del ADN miniprep pCR-Blunt II-TOPO-OsmADS5-3'-gADN con EcoRI en 20 µL de mezcla de reacción que contiene 2 µg de BSA y 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 2 horas y luego los productos de pCR-Blunt II-TOPO-OsmADS5-3'-gADN (EcoRI) se resolvieron en 1% de agarosa TAE. Los clones de pCR-Blunt II-TOPO-OsmADS5-3'-gADN positivos se secuenciaron.

C. Construcción de la secuencia reguladora 5' de OsmADS5

La secuencia reguladora 5' de OsmADS5 para el casete de expresión fue hecha en varias etapas. La mitad 3' (OsmADS-5Pb, aproximadamente 3.03 kb) se produjo mediante PCR de alta fidelidad proveniente del colon pCR-XL-TOPO-OsmADS5-5'-gADN descrito anteriormente. La mezcla de reacción consistió de 1 µL de ADN miniprep pCR-XL-TOPO-OsmADS5-5'-gADN, 200 µM de dNTP, 20 µM de iniciador de oligonucleótido OsmADS5-C3 5'-cagtgtcgcacggggcgagggaaagtagagc-3' (SEQ ID No. 464), 20 µM de iniciador de oligonucleótido OsmADS5-C4 5'-cgatccatgggtggatactgtttacaaaaagaaaatcagtg-3' (SEQ ID No. 465), 5 µL de amortiguador Pfu clonado 10X y 2.5 unidades de polimerasa de ADN Pfuturbo (Stratagene, Cat. No. 600252) en un volumen final de 50 µL. El programa de termo ciclado fue de 95°C durante 30 segundos luego 40 ciclos de (95°C durante 10 segundos, 50°C

durante 60 segundos, 72°C durante 6 minutos) luego 72°C durante 10 minutos. El producto de ADN OsmADS-5Pb se recuperó utilizando un kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, Cat. No. 28106). El ADN OsmADS-5Pb recuperado fue precipitado con etanol con un vehículo de glicógeno. El ADN OsmADS-5Pb se recuperó mediante micro centrifugación, se lavó con etanol al 70%, se secó bajo vacío y se resuspendió en 14 µL de ddH₂O. El OsmADS-5Pb se digirió en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 µL de SalI y 1 µL NcoI. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante más de 6 horas. El ADN OsmADS-5Pb (NcoI/ SalI) se resolvió sobre 1.0% de agarosa TAE y los 3.03 kb de la banda de ADN OsmADS-5Pb (NcoI/ SalI) se escindió, se recuperó y se precipitó con etanol con un vehículo de glicógeno. El ADN OsmADS-5Pb (NcoI/ SalI) se recuperó mediante micro centrifugación, se lavó con etanol al 70%, se secó bajo vacío y resuspendió en 5 µL de ddH₂O.

2 µg del ADN miniprep pNOV6901 se digirió en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 µL de SalI y 1 µL de NcoI. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante más de 6 horas, luego a 70°C durante 20 minutos. Luego 1 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 µL 1 unidad/ µL CIP y 8 µL de ddH₂O se agregaron a la reacción y ésta se incubó adicionalmente a 37°C durante 30 minutos. El ADN pNOV6901 (NcoI/SalI/CIP) se resolvió en 1% de agarosa TAE y la banda de 4.7 kb de pNOV6901 (NcoI/SalI/CIP) se escindió, se recuperó y se precipitó con etanol con un vehículo de glicógeno. El ADN

pNOV6901 (NcoI/SalI/CIP) se recuperó mediante micro centrifugación, se lavó con etanol al 70% se secó bajo vacío y se resuspendió en 5 µL de ddH₂O.

4.0 µL del OsmADS-5Pb (NcoI/SalI) se ligó a 4.0 µL de pNOV6901 (NcoI/SalI/CIP) en una mezcla de reacción de 10 µL que contiene 1 µL de amortiguador de ligasa 10X T4 ADN y 1 µL de ligasa T4 ADN (400 unidades/ µL) y se incubó más de 8 horas a 16°C. 5.0 µL de la mezcla de ligación se transformaron en 50 µL de células competentes Top 10. Los recombinantes pNOV6901-OsmADS-5Pb se verificaron al digerir 2 µL del ADN miniprep pNOV6901-OsmADS-5Pb con 0.5 µL SalI, 0.5 µL NcoI en reacciones de 10 µL que contienen 1 µg de BSA y 1 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos fueron incubados a 37°C durante 2 horas y el ADN pNOV6901-OsmADS-5Pb (NcoI/SalI) se resolvió sobre 1% de agarosa TAE. Los recombinantes pNOV6901-OsmADS-5Pb fueron secuenciados.

La mitad 5' (OsmADS-5Pa, aproximadamente 2.4 kb) se produjeron mediante PCR de alta fidelidad del clon PCR-XL-TOPO-OsmADS5-5'-gADN descritos anteriormente. La mezcla de reacción consistió de 1 µL de ADN miniprep PCR-XL-TOPO-OsmADS5-5'-gADN, 200 µM de dNTP, 20 µM de iniciador de oligonucleótido OsmADS5-C1 5'-gactctcgaggcgcgccctgagcaggtagccggcgacc-3' (SEQ ID No.466), 20 µM de iniciador de oligonucleótido OsmADS5-C2b 5'-gtgtgtctcgagctctctctagctctctctcgg-3' (SEQ ID No.467), 5 µL de amortiguador Pfu clonado 10X y 2.5 unidades de polimerasa de ADN PfuTurbo (Stratagene, Cat. No. 600252) en un volumen final de 50 µL. El programa de termo ciclado fue de 95°C durante 30 segundos luego 40 ciclos de (95°C durante 10 segundos, 50°C durante 60

segundos, 72°C durante 6 minutos) luego 72°C durante 10 minutos. El producto de 2.4 kb de OsmADS-5Pa de ADN fue clonado con el kit de clonación Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen, Cat. No. K2875-20). Los recombinantes pCR-BluntII-TOPO-OsmADS-5Pa fueron identificados al digerir 5 µL del ADN miniprep pCR-BluntII-TOPO-OsmADS-5Pa con EcoRI en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA y 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incubaron a 37°C durante 2 horas luego se resolvieron en 1% de agarosa TAE. Los recombinantes pCR-BluntII-TOPO-OsmADS-5Pa positivos fueron secuenciados.

2 µg del ADN miniprep pNOV6901-OsmADS-5Pb se digirieron en una mezcla de reacción de 20 µL que contenía 2 µg de BSA, 2 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 µL de XhoI. El digerido se incubó a 37°C durante más de 6 horas, luego a 70°C durante 20 minutos. Luego 1 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 µL 1 unidad/ µL CIP y 8 µL de ddH₂O fueron agregados a la reacción y ésta se incubó adicionalmente a 37°C durante 30 minutos. 2 µg del ADN miniprep pCR-BluntII-TOPO-OsmADS-5Pa se ingirieron en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 µL de SalI. El digerido se incubó a 37°C durante más de 6 horas.

Los ADN del plásmido digeridos, pNOV6901-OsmADS-5Pb (XhoI/CIP) y el pCR-BluntII-TOPO-OsmADS-5Pa(SalI), se resolvieron sobre 1% de agarosa TAE y los 7.7 kb de pNOV6901-OsmADS-5Pb (XhoI/CIP) y las bandas de 2.4 kb de OsmADS-5Pa(SalI) se

escindieron, extrajeron, recuperaron y precipitaron con glicógeno. Los fragmentos de ADN pNOV6901-OsMADS-5Pb (XhoI/CIP) y OsMADS-5Pa (SalI) se recuperaron mediante micro centrifugación, se lavaron con 70% de etanol, se secaron bajo vacío y se resuspendieron cada uno en 5 μ L de ddH₂O.

4.0 μ L del pNOV6901-OsMADS-5Pb (XhoI/CIP) se ligaron a 4.0 μ L de OsMADS-5Pa (SalI) en una mezcla de reacción de 10 μ L que contiene 1 μ L de amortiguador de ligasa 10X T4 ADN y 1 μ L de ligasa T4 ADN (400 unidades/ μ L). La mezcla de reacción se incubó más de 8 horas a 16°C. 5.0 μ L de la mezcla de ligación se transformó en 50 μ L de células competentes Top 10. Los recombinantes de pNOV6901-OsMADS5P se verificaron al digerir 2 μ L del ADN miniprep pNOV6901-OsMADS5P con 0.5 μ L XhoI, 0.5 μ L NcoI en 10 μ L de mezclas de reacción que contienen 1 μ g de BSA y 1 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos fueron incubados a 37°C durante 2 horas luego resueltos sobre 1% de agarosa TAE. Los recombinantes pNOV6901-OsMADS5P positivos fueron secuenciados.

D. Construcción de la secuencia reguladora 3' OsMADS5

La secuencia reguladora 3' OsMADS-5 para el casete de expresión fue producida mediante PCR de alta fidelidad proveniente del clon pCR-BluntII-TOPO-OsMADS5-3'-gADN, anterior. La mezcla de reacción consistió de 1 μ L de ADN miniprep pCR-BluntII-TOPO-OsMADS5-3'-gADN, 200 μ M de dNTP, 20 μ M de iniciador de oligonucleótido OsMADS5T-F 5'-
ccccgggccatgggggggtctagaatgaattgcttatcacattaatgg-3' (SEQ ID NO

468), 20 μ M de iniciador de oligonucleótido OsmADS5T-R 5'-cccgggcgcgccggatgagaacagctacatcc-3' (SEQ ID NO 469), 5 μ L de amortiguador Pfu clonado 10X y 2.5 unidades de polimerasa de ADN Pfuturbo (Stratagene, Cat. No. 600252) en un volumen final de 50 μ L. El programa de termo ciclado fue de 95°C durante 30 segundos luego 40 ciclos de (95°C durante 10 segundos, 50°C durante 60 segundos, 72°C durante 6 minutos) luego 72°C durante 10 minutos. El producto de ADN OsmADS5T se recuperó utilizando un kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, Cat. No. 28106) y el etanol se precipitó con un vehículo de glicógeno. El ADN OsmADS5T se recuperó mediante micro centrifugación, se lavó con 70% de etanol, se secó bajo vacío y se resuspendió en 14 μ L de ddH₂O. El ADN OsmADS5T se digirió en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA y 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L de XmaI. El digerido se incubó a 37°C durante más de 6 horas. El ADN OsmADS5T (XmaI) se resolvió sobre 1% de agarosa TAE y una banda de 1.1 kb de OsmADS5T (XmaI) se escindió, recuperó y se precipitó con etanol con un vehículo de glicógeno. Los recombinantes pCR-BluntII-TOPO-OsmADS-5Pa positivos fueron secuenciados. El ADN OsmADS5T (XmaI) se recuperó mediante micro centrifugación, se lavó con 70% de etanol, se secó bajo vacío y se resuspendió en 5 μ L de ddH₂O.

2 μ g del ADN miniprep pNOV6901-OsmADS5P se digirieron en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L de XmaI. El digerido se incubó a 37°C durante más de 6 horas, luego a 70°C durante 20 minutos. Entonces 1 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 μ L 1 unidad/ μ L CIP

y 8 μL de ddH_2O se agregaron a la reacción y ésta se incubó adicionalmente a 37°C durante 30 minutos. El ADN pNOV6901-OsMADS5P (XmaI/CIP) se resolvió con 1.0% de agarosa TAE y los 10.1 kb de la banda pNOV6901-OsMADS5P (XmaI/CIP) se escindió, recuperó y se precipitó con etanol con un vehículo de glicógeno. El ADN pNOV6901-OsMADS5P (XmaI/CIP) se recuperó mediante micro centrifugación, se lavó con 70% de etanol, se secó bajo vacío y se resuspendió cada uno en 5 μL de ddH_2O .

4.0 μL pNOV6901-OsMADS5P (XmaI/CIP) se ligó a 4.0 μL de OsMADS5T (XmaI) en una mezcla de ligación de 10 μL que contiene 1 μL de amortiguador de ligasa de 10X T4 ADN y 1 μL de ligasa T4 ADN (400 unidades/ μL) y se incubó más de 8 horas a 16°C . 5.0 μL de la mezcla de ligación se transformaron en 50 μL de las células competentes Top 10. Los recombinantes pNOV6901-OsMADS5P/OsMADS5T positivos se verificaron al digerir 2 μL de ADN miniprep con 1.0 μL de AscI en mezclas de reacción de 10 μL que contiene 1 μg de BSA y 1 μL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos fueron incubados a 37°C durante 2 horas luego resueltos sobre 1% de agarosa TAE. Los recombinantes pNOV6901-OsMADS5P/OsMADS5T positivos fueron secuenciados. La construcción se diseño pNOV6901-OsMADS5P/OsMADS5T. El número QC del plásmido es 11084. El 11084 contiene el casete de expresión completa del OsMADS5 descrito mediante la SEQ ID NO. 536.

E. Movilización del casete de expresión OsMADS5 GUS en pNOV6900

2 µg de pNOV6900 se digirió en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 µL AscI. El digerido se incubó a 37°C durante más de 6 horas, luego a 70°C durante 20 minutos. Luego 1 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 µL 1 unidad/ µL CIP y 8 µL de ddH₂O se agregaron a la reacción y ésta se incubó adicionalmente a 37°C durante 30 minutos. 2 µg de ADN miniprep pNOV6901-OsMADS5P/OsMADS5T se digirió en 20 µL de mezcla de reacción que contiene 2 µg de BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 µL de AscI. El digerido se incubó a 37 °C durante más de 6 horas.

Los ADN del plásmido digerido, pNOV6900 (AscI/CIP) y pNOV6901-OsMADS5P/OsMADS5T (AscI), se resolvieron sobre 1% de agarosa TAE y los 9.2 kb de pNOV6900 (AscI/CIP) y las bandas de 8.7 kb del ADN pNOV6901-OsMADS5P/OsMADS5T (AscI) fueron escindidas, recuperadas y precipitadas con etanol con un vehículo de glicógeno. El pNOV6900 (AscI/CIP) y el pNOV6901-OsMADS5P/OsMADS5T (AscI) los fragmentos de ADN fueron recuperados mediante micro centrifugación, lavados con 70% de etanol, secados bajo vacío y resuspendidos en 5 µL de ddH₂O cada uno.

4.0 µL de pNOV6900 (AscI/CIP) se ligó a 4.0 µL de pNOV6901-OsMADS5P/OsMADS5T (AscI) en una mezcla de ligación de 10 µL que contiene 1 µL del amortiguador de ligasa 10X T4 ADN y 1 µL de ligasa T4 ADN que se incubó más de 8 horas a 16°C. 5.0 µL de la mezcla de ligación se transformaron en 50 µL de células competentes Top 10. Los recombinantes pNOV6900-pNOV6901-OsMADS5P/OsMADS5T se verificaron al digerir 7.5 µL de ADN

miniprep pNOV6900-pNOV6901-OsMADS5P/OsMADS5T con 1.0 μ L de NcoI en reacciones de 10 μ L que contiene 1 μ g de BSA y 1 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos fueron incubados a 37°C durante 2 horas luego resueltos sobre 1% de agarosa TAE. Los recombinantes pNOV6900-pNOV6901-OsMADS5P/OsMADS5T positivos fueron secuenciados. El clon terminado se designó pNOV6911. El número QC del plásmido es 11085.

Las alteraciones trabajadas por ingeniería sobre la secuencia de OsMADS5P incluyen la introducción de un sitio XhoI seguido por un sitio AscI en el extremo 5' de las secuencias OsMADS5P, la eliminación del codón de inicio de traducción natural de la secuencia OsMADS5P, la eliminación de los OFR no deseados en la nueva secuencia líder (5'-UTR) de la secuencia de OsMADS5P, la inserción de una secuencia Kozak corriente arriba del nuevo codón de inicio de traducción de la secuencia de OsMADS5P y la inserción de un nuevo codón de inicio de traducción corriente a bajo de la unión del intron1/exon2 como el sitio NcoI en la secuencia OsMADS5P. Las alteraciones trabajadas por ingeniería en la secuencia OsMADS5T incluye la introducción de un sitio XmaI en el terminal 5' de la secuencia OsMADS5T y la introducción del sitio AscI en el terminal 3' de la secuencia OsMADS5T. En esta configuración la secuencia codificante GUS se puede reemplazar con cualquier gen de interés flanqueado por los sitios de restricción NcoI. El casete completo fue entonces escindido como un fragmento AscI y clonado en pNOV6900.

El casete fue transformado en maíz A188 X HyII y arroz Kaybonnet utilizando metodología mediada por agrobacterium estándar.

Expresión GUS en maíz T0

Quince líneas de maíz transgénico T0 fueron generadas. Espigas y punzonados de hojas fueron cosechadas justo antes de la esparción del polen y seleccionadas histo químicamente para la actividad GUS. La mazorca proveniente de la planta que contiene múltiples copias de transgen fue sacrificada para examinar la expresión GUS en el desarrollo de inflorescencias. La actividad GUS localizada principalmente para transmitir tejido en la base de cada inflorescencia, y en una menor proporción, los manojos basculares para desarrollar las mazorcas. La actividad GUS también fue evidente para desarrollar las sedas. Estos datos indican que el casete maneja la expresión GUS principalmente en el tejido reproductor femenino.

Expresión GUS en arroces T0

De cuarenta líneas de arroz T0 (cv. Kaybonnet) que contienen pNOV6911 (o 11085), dieciocho transformantes independientes fueron histo químicamente teñidos para la expresión GUS. Solamente cuatro eventos tuvieron actividad GUS detectable en el tejido de hoja. En la mayoría de los eventos, la actividad en las espigas se localizó en las puntas de las brácteas, y las anteras en mucha menor proporción.

Expresión GUS en maíz T1

La progenie T1 proveniente de tres eventos fue cosechada para análisis de expresión en tejido vegetativo y reproductor. La FIG. 3 resume los datos para tejido muestreado aproximadamente 5 días antes de la polinización. Las FIGS. 3A y 3B muestran que la actividad GUS esta restringida a las mazorcas en desarrollo, particularmente la vasculatura a lo largo de la mazorca exterior y el tejido trasmisor por debajo de las inflorescencias. La FIG. 3B también muestra la actividad GUS en el tejido circundante al saco del óvulo. La actividad GUS no fue detectable en el nodo de la mazorca o el nodo inmediatamente debajo de éste, la espiguilla, hoja o seda (FIGS. 3C-3G). Las FIGS. 4 y 5 suministran evidencia adicional para la actividad GUS en las mazorcas en desarrollo. Los datos muestran el patrón establecido 5 días antes de la polinización persisten hasta dos días después de la polinización. La actividad GUS se restringe para transmitir tejido y tejido maternal en la base de los Granos en desarrollo durante el desarrollo de la semilla. La proteína GUS es detectable a través del ovulo y del desarrollo del grano, hasta 20 días después de la polinización. La FIG. 25A muestra un teñido muy ligero en el tejido aereo, sin actividad GUS en las raíces.

En resumen, la presente invención incluye casetes de expresión con base en el gen OsMADS5 de *Oryza sativa*. Estos casetes consisten del promotor del gen que incluye el primer intrón, el 5'-UTR, el 3'-UTR y la secuencia no transcrita 3'. El diseño del casete facilita el reemplazo de la secuencia codificante GUS con cualquier gen de interés. El casete maneja la

expresión del gen primariamente en tejido reproductor maternal. Dentro de las mazorcas en desarrollo, la expresión localiza la vasculatura exterior a lo largo del eje largo de la mazorca, el tejido trasmisor en las inflorescencias y granos en desarrollo, el tejido que circunda los óvulos y el tejido maternal en la base de los granos en desarrollo. Los casetes de expresión de la presente invención manejan la expresión del gen proveniente de cada punto temprano en el desarrollo del ovulo, quizás desde poco después de la diferenciación.

Ejemplo 4. Construcción del casete de expresión OsmADS6

A. Clonación de la secuencia reguladora 5' de OsmADS6

El PCR de alta fidelidad utilizado para amplificar las secuencias reguladoras 5' OsmADS6 proveniente de ADN genómico de arroz (gADN). La mezcla de reacción de 50 µL consistió de 100 ng de gADN de arroz, 200 µM de dNTP, 1 µL 20 µM del iniciador de oligonucleótido OsmADS#6-P1 5'-ctaggacgatggtgtgatgtgggaacacg-3' (SEQ ID NO 470), 1 µL 20 µM del iniciador de oligonucleótido OsmADS#6-P2 5'-gtacctttctaaagtctttgttatgctgcac-3' (SEQ ID NO 471), 1 µL de amortiguador de Alta Fidelidad Expnd 10X y 1 µL de polimerasa de Alta Fidelidad Expand. El programa de termo ciclado fue a 95°C durante 2 minutos seguido por 40 ciclos de (94°C durante 15 segundos, 68°C durante 7.5 minutos) seguido por 68°C durante 10 minutos. Clonado el producto de ADN de 4.5 kb de OsmADS6-5'-gADN con el kit de clonación TOPO XL PCR. Los recombinantes de pCR-XL-TOPO-OsmADS6-5'-gADN se identificaron al digerir 5 µL de ADN miniprep pCR-XL-TOPO-OsmADS6-5'-gADN con

EcoRI en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA y 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos fueron incubados a 37°C durante 2 horas y luego los productos fueron resueltos sobre 1% de agarosa TAE. Los clones pCR-XL-TOPO-OsMADS6-5'-gADN positivos fueron secuenciados.

B. Clonación de la secuencia reguladora 3' del OsMADS6

La secuencia reguladora 3' del OsMADS6 proveniente del ADN genómico del arroz (gADN) se amplificó utilizando PCR de alta fidelidad. La mezcla de reacción de 50 μ L consistió de 100 ng de gADN de arroz, 200 μ M de dNTP, 1 μ L 20 μ M de iniciador de oligonucleótido OsMADS#6-T1 5'-gctaagcagccatcgatcagctgtcag-3' (SEQ ID NO 470), 1 μ L 20 μ M del iniciador de oligonucleótido OsMADS#6-T2 5'-gatgccattgtgtaatgaatggaggagagc-3' (SEQ ID NO 471), 1 μ L de amortiguador de Alta Fidelidad Expnd 10X y 1 μ L de polimerasa de Alta Fidelidad Expand. El programa de termo ciclado fue a 95°C durante 2 minutos seguido por 40 ciclos de (94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos, 68°C durante 6 minutos) seguido por 68°C durante 15 minutos. El producto de ADN de 1.2 kb fue clonado con el kit de clonación Zero Blunt TOPO PCR. Los recombinantes pCR-II-Blunt-OsMADS6-3'-gADN fueron identificados al digerir 5 μ L ADN miniprep pCR-II-Blunt-OsMADS6-3'-gADN con EcoRI en una mezcla de reacción de 20 μ L que contienen 2 μ g de BSA en 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. El digerido se incubó a 37°C durante 2 horas luego se resolvió sobre 1% de agarosa TAE. Los clones pCR-II-Blunt-OsMADS6-3'-gADN positivos fueron secuenciados.

C. Construcción de la secuencia reguladora 5' del OsmADS6

La secuencia reguladora 5' del OsmADS6 del casete de expresión se hizo en varios pasos. La mitad 3' (OsmADS-6Pb, aproximadamente 2.96 kb) se produjo mediante PCR de alta fidelidad proveniente del clon de secuencia reguladora del gen 5' OsmADS6, anterior. La mezcla de reacción consistió de 1 µL de ADN miniprep pCR-XL-TOPO-OsmADS6-5'-gADN, 200 µM de dNTP, 20 µM de iniciador de oligonucleótido OsmADS6-P3b 5'-cgagtcgacgaggggaagagttgagctgag-3' (SEQ ID NO 474), 20 µM de iniciador de oligonucleótido OsmADS6-P4c 5'-gactccatggtggttatgctgcacaaaaatg-3' (SEQ ID NO 474), 5 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2.5 unidades de polimerasa de ADN PfuTurbo (Stratagene, Cat. No. 600252) en un volumen final de 50 µL. El programa de termo ciclado fue de 95°C durante 30 segundos luego 40 ciclos de (95°C durante 10 segundos, 50°C durante 60 segundos, 72°C durante 6 minutos) luego 72°C durante 10 minutos. El producto de ADN fue clonado con kit de clonación Zero Blunt TOPO PCR. Los recombinantes pCR-Blunt-II-TOPO-OsmADS6-Pb fueron identificados mediante digeridos 5 µL ADN miniprep pCR-Blunt-II-TOPO-OsmADS6-Pb con EcoRI en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA y 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos fueron incubados a 37° C durante 2 horas luego se resolvieron en 1% de agarosa TAE. Los recombinantes pCR-Blunt-II-TOPO-OsmADS6-Pb fueron secuenciados.

La mitad 5' (OsmADS-6Pa, aproximadamente 1.5 kb) se produjo mediante PCR de alta fidelidad proveniente del clon pCR-XL-TOPO-

OsmADS6-5'-gADN descrito anteriormente. La mezcla de reacción consistió de 1 µL de ADN miniprep pCR-XL-TOPO-OsmADS6-5'-gADN, 200 µM de dNTP, 20 µM de iniciador de oligonucleótido OsmADS6-C1b 5'-cagtgcgatgcggaccgctaggacgatggtgtgatgtg-3' (SEQ ID NO 474), 20 µM de iniciador de oligonucleótido OsmADS6-Paa 5'-cctcgtcgactcgcccgatcgatcgaacg-3' (SEQ ID NO 477), 5 µL de amortiguador Pfu clonado 10X y 2.5 unidades de polimerasa de ADN Pfuturbo en un volumen final de 50 µL. El programa de termociclado fue de 95°C durante 30 segundos luego 40 ciclos de (95°C durante 10 segundos, 50°C durante 60 segundos, 72°C durante 6 minutos) luego 72°C durante 10 minutos. El producto ADN 1.5 kb OsmADS6-Pa fue clonado con el kit de clonación Zero Blunt TOPO PCR. Los recombinantes pCR-Blunt-II-TOPO-OsmADS6-Pa fueron identificados al digerir 5 µL ADN miniprep pCR-Blunt-II-TOPO-OsmADS6-Pa con EcoRI en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA en 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. El digerido se incubó a 37°C durante 2 horas luego se resolvió sobre 1% de agarosa TAE. Los recombinantes pCR-Blunt-II-TOPO-OsmADS6-Pa fueron secuenciados.

14 μ L de ADN miniprep pCR-Blunt-II-TOPO-OsMADS6-Pb se digirió en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 μ L SalI y 1 μ L NcoI. El digerido se incubó a 37°C por más de 6 horas. El digerido ADN se resolvió sobre 1.0% de agarosa TAE y la banda ADN de 2.96 kb OsMADS6-Pb (SalI/NcoI) se escindió, recuperó y se precipitó en etanol con glicógeno. El ADN OsMADS6-Pb (SalI/NcoI) se recuperó mediante micro centrifugación, se lavó con

70% de etanol, se secó bajo vacío y se resuspendió en 5 μ L de ddH₂O.

2 μ g de ADN miniprep pNOV6901 se digirió en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 μ L SalI y 1 μ L NcoI. El digerido se incubó a 37°C durante más de 6 horas, luego a 70°C durante 20 minutos. Luego 1 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción apropiado 10X, 1 μ L 1 unidad/ μ L CIP y 8 μ L de ddH₂O se agregaron a la reacción y ésta fue incubada adicionalmente a 37°C durante 30 minutos. El ADN plásmido de digerido se resolvió sobre 1.0% de agarosa TAE y la banda 4.7 kb de pNOV6901 (SalI/NcoI/CIP), se escindió, recuperó y se precipitó en etanol con glicógeno. El ADN pNOV6901 (SalI/NcoI/CIP) se recuperó mediante micro centrifugación, se lavó con 70% de etanol, se secó bajo vacío y se resuspendió en 5 μ L de ddH₂O.

4.0 μ L OsMADS6-Pb (SalI/NcoI) se ligó a 4.0 μ L de pNOV6901 (SalI/NcoI/CIP) en una mezcla de ligación de 10 μ L que contiene 1 μ L de amortiguador de ligasa de 10X T4 ADN y 1 μ L de ligasa T4 ADN (400 unidades/ μ L). La mezcla de ligación se incubó durante más de 8 horas a 16°C. 5.0 μ L de mezcla de ligación fue formada en 50 μ L de células de componente Top 10. Los recombinantes fueron verificados al digerir ADN miniprep pNOV6901-OsMADS6-Pb con 0.5 μ L SalI, 0.5 μ L NcoI en una mezcla de reacción de 10 μ L que contiene 1 μ g de BSA y 1 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incubaron a 37°C durante 2 horas luego se resolvieron sobre 1% de agarosa TAE. Los recombinantes pNOV6901-OsMADS6-Pb positivos fueron secuenciados.

2 µg de ADN miniprep pNOV6901-OsMADS6-Pb se digirió en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 µL SalI y 1 µL SphI. El digerido se incubó a 37°C durante más de 6 horas, luego a 70°C durante 20 minutos. Luego 1 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción apropiado 10X, 1 µL 1 unidad/ µL CIP y 8 µL de ddH₂O se agregaron a la reacción y ésta fue incubada adicionalmente a 37°C durante 30 minutos. 2 µg de ADN miniprep pCR-Blunt-II-TOPO-OsMADS6-Pa se digirió en una reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 µL SalI y 1 µL SphI. El digerido se incubó a 37°C durante más de 6 horas.

El digerido de plásmido de ADN, pNOV6901-OsMADS6-Pb (SalI/SphI/CIP) y pCR-Blunt-II-TOPO-OsMADS6-Pa (SalI/SphI), se resolvió en 1.0% de agarosa TAE y el 7.7 kb pNOV6901-OsMADS6-Pb (SalI/SphI/CIP) y la banda 1.5 kb OsMADS6-Pa (SalI/SphI) se escindió, recuperó y se precipitó en etanol con un vehículo de glicógeno. El pNOV6901-OsMADS6-Pb (SalI/SphI/CIP) y OsMADS6-Pa (SalI/SphI) fragmentos ADN se recuperaron mediante micro centrifugación, se lavaron con 70% de etanol, se secaron bajo vacío y se resuspendieron en 5 µL de ddH₂O.

4.0 µL pNOV6901-OsMADS6-Pb (SalI/SphI/CIP) se ligó a 4.0 µL de OsMADS6-Pb (SalI/SphI) en una mezcla de ligación de 10 µL que contiene 1 µL de amortiguador de ligasa de 10X T4 ADN y 1 µL de ligasa T4 ADN (400 unidades/ µL). La mezcla de reacción se incubó durante más de 8 horas a 16°C. 5.0 µL de mezcla de ligación fue

formada en 50 μ L de células de componente Top 10. Los recombinantes pNOV6901-OsMADS6P fueron verificados al digerir 7.5 μ L ADN miniprep pNOV6901-OsMADS6P con 0.5 μ L SphI, 0.5 μ L NcoI en una reacción de 10 μ L que contiene 1 μ g de BSA y 1 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incubaron a 37°C durante 2 horas luego se resolvieron sobre 1% de agarosa TAE. Los recombinantes pNOV6901-OsMADS6P positivos fueron secuenciados.

D. Construcción de la secuencia reguladora 3' del OsMADS6

La secuencia reguladora 3' del OsMADS-6 del casete de expresión, aproximadamente 1.3 kb se produjo mediante PCR de alta fidelidad proveniente del clon pCR-II-Blunt-OsMADS-6-3'-gADN, anterior. La mezcla de reacción consistió de 1 μ L de ADN miniprep pCR-II-Blunt-OsMADS6-3'-gADN, 200 μ M de dNTP, 20 μ M de iniciador de oligonucleótido OsMADS6-C4b 5'-acgtgagctcgctaagcagccatcgatcag-3' (SEQ ID NO 478), 20 μ M de iniciador de oligonucleótido OsMADS6-C2 5'-actgCGGaccgatgccattgtgtaatgaatgg-3' (SEQ ID NO 479), 5 μ L de amortiguador Pfu clonado 10X y 2.5 unidades de polimerasa de ADN PfuTurbo en un volumen final de 50 μ L. El programa de termo ciclado fue de 95°C durante 30 segundos luego 40 ciclos de (95°C durante 10 segundos, 50°C durante 60 segundos, 72°C durante 6 minutos) luego 72°C durante 10 minutos. El producto de ADN de 1.3 kb OsMADS6T se recuperó y precipitó en etanol con glicógeno. El ADN OsMADS6T se recuperó mediante micro centrifugación, se lavó con 70% de etanol, se secó bajo vacío y se resuspendió en 14 μ L de ddH₂O. El ADN OsMADS6T se digirió en 20 μ L de mezcla de reacción que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de

endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L SmaI. El digerido se incubó a 37° C durante más de 6 horas. El ADN OsMADS6T (SmaI) se resolvió sobre 1% de agarosa TAE y la banda 1.3 kb OsMADS6T (SmaI) se escindió, recuperó y precipitó en etanol con un vehículo de glicógeno. El ADN OsMADS6T (SmaI) se recuperó mediante micro centrifugación, se lavó con 70% de etanol, se secó bajo vacío y se resuspendió en 5 μ L de ddH₂O.

2 μ g de ADN miniprep pNOV6901-OsMADS6P se digirió en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L SmaI. El digerido se incubó a 37°C durante más de 6 horas, luego a 70°C durante 20 minutos. Luego 1 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción apropiado 10X, 1 μ L 1 unidad/ μ L CIP y 8 μ L de ddH₂O se agregó a la reacción y ésta fue incubada adicionalmente a 37°C durante 30 minutos. El ADN pNOV6901-OsMADS6P (SmaI/CIP) se resolvió sobre 1.0% de agarosa TAE y la banda 9.7 kb de pNOV6901-OsMADS6P (SmaI/CIP) se escindió, recuperó y se precipitó en etanol con un vehículo de glicógeno. El pNOV6901-OsMADS6P (SmaI/CIP) fragmento de ADN se recuperó mediante micro centrifugación, se lavó con 70% de etanol, se secó bajo vacío y se resuspendió en 5 μ L de ddH₂O.

4.0 μ L pNOV6901-OsMADS6P (SmaI/CIP) se ligó a 4.0 μ L de OsMADS6T (SmaI) en una mezcla de reacción de 10 μ L que contiene 1 μ L de amortiguador de ligasa de 10X T4 ADN y 1 μ L de ligasa T4 ADN (400 unidades/ μ L). La mezcla de reacción se incubó durante más de 8 horas a 16°C. 5.0 μ L de mezcla de ligación fue formada en 50 μ L de células de componente Top 10. Los recombinantes

fueron verificados al digerir ADN miniprep pNOV6901-OsMADS6P/OsMADS6T con 1.0 μ L RsrII en una mezcla de reacción de 10 μ L que contiene 1 μ g de BSA y 1 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incubaron a 37°C durante 2 horas luego se resolvieron sobre 1% de agarosa TAE. Los recombinantes pNOV6901-OsMADS6P/OsMADS6T positivos fueron secuenciados. El vector designado pNOV6901-OsMADS6P/OsMADS6T. El número QC del plásmido es 11082. El 11082 contiene el casete de expresión descrito mediante la SEQ ID NO.537.

E. Movilización de un casete de expresión del OsMADS6 GUS en un pNOV6900

Se digiere 2 μ g de pNOV6900 en 20 μ L de mezcla de reacción que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L de RsrII. El digerido se incuba a 37° C por más de 6 horas, luego a 70° C durante 20 minutos. Entonces 1 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 μ L 1 unidad/ μ L de CIP y 8 μ L ddH₂O se agregan a la reacción y esta se incuba adicionalmente a 37° C durante 30 minutos. Se digiere 2 μ g de pNOV6901-OsMADS6P/OsMADS6T miniprep ADN en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g BSA, 2 μ L amortiguador endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L RsrII. El digerido se incuba a 37° C durante más de 6 horas.

Los plásmidos de ADN pNOV6900 (RsrII/CIP) y el pNOV6901-OsMADS6P/OsMADS6T (RsrII) se redisuelve en 1.0% de agarosa TAE, y las bandas de 9.2 kb pNOV6900 (RsrII/CIP) y la banda de 8.0 kb

pNOV6901-OsMADS6P/OsMADS6T (RsrII) se cortan, se recuperan y se precipita etanol con el portador de glicógeno. Los fragmentos de ADN pNOV6900 (RsrII/CIP) y pNOV6901-OsMADS6P/OsMADS6T (RsrII) se recuperan microcentrifugación, se lavan con 70% de etanol, se secan bajo vacío y se resuspenden en 5 µL ddH₂O cada uno.

4.0 µL pNOV6900 (RsrII/CIP) se liga a 4.0 µL de pNOV6901-OsMADS6P/OsMADS6T (RsrII) en una mezcla de ligación de 10 µL que contiene 1 µL de amortiguador de ligasa ADN T4 10X y 1 µL de ligasa ADN T4 (400 U/µL). La mezcla de ligación se incuba más de 8 horas de 16° C. 5.0 µL de mezcla de ligación se transforma en 50 µL de células componente Top 10. Los recombinantes pNOV6900-pNOV6901-OsMADS6P/OsMADS6T se verifican al digerir 2 µL de ADN miniprep con 1.0 µL de NcoI en 10 µL de mezcla de reacción que contiene 1 µg BSA y 1 µg de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% de agarosa TAE. Se secuencian los recombinantes positivos pNOV6900-pNOV6901-OsMADS6P/OsMADS6T. El clon terminado se designa pNOV6907. El número QC del plásmido es 11083.

Las alteraciones hechas por ingeniería en la secuencia reguladora 5' derivadas del gen OsMADS6 incluyen la introducción de un sitio SphI seguido por un sitio RsrII en el extremo 5' del OsMADS6P,, la eliminación del codón de inicio de traducción natural en OsMADS6P, eliminación de estructuras de lectura abierta no deseadas en la secuencia líder no traducida 5' nueva transcrita del OsMADS6P, la inserción de una secuencia Kozak corriente arriba del nuevo codón de inicio de traducción en el

OsMADS6P y la nueva inserción del codón de inicio de traducción corriente debajo de la articulación intrón 1/exón 2 en OsMADS6P como un sitio NcoI. Las alteraciones hechas por ingeniería en la secuencia reguladora de gen 3' se deriva del gen OsMADS6 que incluye la introducción de un sitio SacI en el terminal 5' en el OsMADS6T y la introducción de un sitio RsrII en el terminal 3' de OsMADS6T. En esta configuración la secuencia de codificación GUS se puede reemplazar por cualquier gen de interés flanqueado por los sitios de restricción NcoI/NotI NcoI/ScaI. El casete completo se moviliza, como un fragmento RsrII, al vector binario pNOV6900.

El casete se transforma en A188X HyII de maíz y Kaybonnet de arroz utilizando metodología estándar mediada por agrobacterium.

La expresión GUS en maíz T0.

Se generan líneas de maíz transgénico T0 102. Se seleccionan histoquímicamente espiguillas para actividad GUS. 64 eventos son positivos para actividad GUS en la gluma de espiguilla, y también algún teñido positivo en la base de la espiguilla. Cincuenta y seis también mostraron la expresión GUS en hojas perforadas. Se sacrifican mazorcas de varias plantas para examinar la expresión GUS en desarrollo de florecillas. La actividad GUS localiza primariamente manojos vasculares en el desarrollo de las mazorcas que aparecen conectadas para transmitir tejido en cada florecilla. Estos datos indican que los casetes controlan primariamente la expresión GUS en el tejido reproductor femenino.

Expresión GUS en arroz T0.

Cuarenta y dos líneas de arroz T0 que contienen pNOV6907 se generan. Se tiñen histoquímicamente 20 transformantes independientes para expresión GUS. Se detecta actividad GUS leve a fuerte en tejido de hojas. En la mayoría de los eventos, la actividad en la espiguilla localizada a glumas. La intensidad del teñido varía significativamente. Se recolecta semilla para cada línea, pero no se analiza adicionalmente.

Expresión GUS en maíz T1.

La progeni T1e de dos transformantes independientes se siembran y analizan en detalle para expresión GUS. Las Figuras 8A-8C muestran que no hay expresión GUS detectable en estigma, hoja y espiguilla. Esto indica que la expresión de la hoja y espiguilla observada en plantas T0 puede resultar del tejido cultivado asociado con el proceso de transformación. Los órganos disectados de espiguillas T1 no tienen actividad GUS aparente (datos no mostrados). Las figuras 8D-8E muestran actividad GUS en el nodo de mazorca y el desarrollo de brote de mazorca. La figura 8D muestra actividad GUS residual en la médula central, y la mayor actividad en el desarrollo de espiguillas. La actividad de la espiras se confina al nodo, las espiras exteriores y la región central. La médula por debajo del nodo de la mazorca no tiene actividad GUS detectable. La Figura 9 muestra la actividad GUS en las mazorcas de 8 a 2 días antes de polinización. Como en las mazorcas T0, la actividad se confina a vaculatura, florecillas y tejido transmisor. La actividad GUS post polinización mantiene confinado a los mismos tejidos. (Figura 10). La actividad en el

desarrollo de los granos parece restringido al tejido materno. La Figura 11 muestra que este patrón persiste a través del desarrollo del grano. No se detecta actividad en el endosperma o desarrollo embrionario, este localiza la placenta, las regiones funiculares e hilares del desarrollo de los granos. La proteína GUS es detectable a través del óvulo y el desarrollo del grano, hasta 20 días después de polinización. Estos datos soportan el casete OsmADS6 como un muy buen candidato para la expresión de rasgos en el desarrollo de florecillas y granos. Cuando se controlan por el casete de expresión basadas en OsmADS6, los genes que facilitan la descarga de floema tal como transportador de invertasa o sucrosa debe suministrar efectividad en soportar el desarrollo temprano de la espiga al incrementar la fuerza de drenado. La Figura 25B muestra un teñido muy ligero o no teñido en el tejido aéreo sin actividad GUS en las raíces.

En una modalidad de la invención hay un casete de expresión basado en el gen *Oryza sativa* OsmADS6. El casete de expresión consiste del promotor de gen que incluye la primer secuencia no transcrita 3', 5'-UTR y 3'-UTR. Estos componentes se basan en el casete de expresión GUS y se ensayan en plantas transgénicas. El diseño del casete facilita el reemplazo de las secuencias que codifica el GUS con cualquier gen de interés. El casete de expresión controla principalmente la expresión del gen en tejido reproductivo materno. Dentro del desarrollo de las espigas, la expresión localiza a las florecillas, componentes maternos del desarrollo de granos, tejido transmisor o placentar o vasculatura. Los casetes de la presente invención controla adicionalmente la expresión del gen desde un punto muy temprano

en el desarrollo del óvulo, quizá desde poco después de la diferenciación.

Ejemplo 5: Construcción de casete de expresión OSMADS8

A. Clonación la secuencia reguladora 5' OSMADS8

La secuencia reguladora 5' OSMADS8 de ADN genómico de arroz (gADN) se amplifica utilizando PCR de alta fidelidad. La mezcla de reacción de 50 μ consiste de 100 ng de gADN de arroz, 200 μ M dNTPs 20 μ M de Iniciador de oligonucleótido OsmADS8.P1 5'-ggtatcttttccaaagttctggtcatgctgc-3' (SEQ ID NO 522), 1 μ L 20 μ M de Iniciador de oligonucleótido OsmADS8.P2 5'-ccatttttttgcgaaatgccaaatcctggc-3' (SEQ ID NO 523), 1 μ L de amortiguador de alta fidelidad 10X expand y 1 μ L de polimerasa de alta fidelidad Expand. El programa de termociclización se hizo a 95 grados durante dos minutos seguido por 40 ciclos de (94° C durante 15 segundos, 68° C durante 7.5 minutos) seguido por 68° C durante 10 minutos. El producto de ADN de 5.2 kb OsmADS8-5' gADN se clona con el kit de clonación TOPO XL PCR. El pCR-XL-TOPO-OsmADS8-5'-gDNA se identifica al digerir 5 μ L de ADN miniprep pCR-XL-TOPO-OsmADS8-5' con EcoRI en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g BSA y 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% de agarosa TAE. Se secuencian los clones pCR-XL-TOPO-OsmADS8-5'gADN positivos.

B. Clonación de la secuencia reguladora 3' OsmADS8

La secuencia reguladora 3' OsmAD8 del ADN genómico de arroz (gADN) se amplifica utilizando PCR de alta fidelidad. La mezcla de reacción 50 µL consiste de 100 ng de gADN de arroz, 200 µM dNTPs, 1 µL 20 µM de Iniciador de oligonucleótido OsmADS8.T1 5'-acgtgagctcactcctgaaggccgatgacgacaacc-3' (SEQ ID NO 480), 1 µL 20 µM de Iniciador de oligonucleótido de OsmADS8.T2 5'-agtcacgatcatgacaaaaatcatgtttatttcgagg-3' (SEQ ID NO 481), 1 µL de amortiguador de alta fidelidad expand 10X y 1 µL de polimerasa de alta fidelidad Expand. El programa de termociclización se realizó a 95° C durante 2 minutos seguido por 40 ciclos de (94° C durante 15 segundos, 60° C durante 30 segundos, 68° C durante 6 minutos). El producto de ADN de 2.04 kb OsmADS8-3'-gDNA clonado con el kit de clonación PCR Zero Blunt TOPO. Se identifican los recombinantes PCR-Blunt-II OsmADS8-3'-gDNA al digerir 5 µL de ADN miniprep con mezcla de reacción EcoRI 20 µL que contiene 2 µg BSA y 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% de agarosa TAE. Se secuencian los clones pCR-Blunt-II-OsmADS 8-3 '-gDNA positivos.

C. Construcción de secuencia reguladora OsmADS 85'.

La secuencia reguladora OsmADS para el casete de expresión se hace en varias etapas. Se produce la mitad 3' (OsmADS-8Pb, aproximadamente 2.8 kb) por pCr de alta fidelidad de pCR-XL-TOPO-OsmADS8-5'-gADN anterior. La mezcla de reacción consiste de 1 µL de ADN miniprep de pCR-XL-TOPO-OsmADS8-5'-gADN, 200 µM dNTP, 20 µM de Iniciador de oligonucleótido OsmADS8-Pcc 5'-atcgccatgggtgggtcaagctgcaagtttcaaaaacac-3' (SEQ ID NO 482), 20 µM

de Iniciador de oligonucleótido OsmADS8-C3 5'-acgtgtcgcacgagagggagggtgga-3' (SEQ ID NO 483), 5 µL de amortiguador Pfu clonado 10X y 2.5 unidades de polimerasa de ADN Pfuturbo en un volumen final de 50 µL. El programa de termociclización se hizo a 95° C durante 30 segundos luego 40 ciclos de 95° C durante 10 segundos, 50° C durante 60 segundos, 72° C durante 6 minutos) luego 72° C durante 10 minutos. Se clona 2.8 kb del producto OsmADS-8Pb ADN con el kit de clonación Zero Blunt TOPO PCR. Los recombinantes pCR-Blunt-II-TOPO-OsmADS-8Pb se identifica al digerir 5µ de ADN miniprep pCR-Blunt-II-TOPO-OsmADS-8Pb con EcoRI en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA y 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% de agarosa TAE. Se secuencian los clones pCR-Blunt- II-TOPO-OsmADS-8Pb positivos.

Se produce la mitad 5' (OsmADS-8Pa, aproximadamente 2.4 kb) por PCR de alta fidelidad del PCR- XL-TOPO-OsmADS8-5'-gADN, anterior. La mezcla de reacción consiste de 1 µL de ADN pCR-XL-TOPO-OsmADS8-5'-gADN miniprep, 200 µM de mezcla dNTP, 20 µM de Iniciador de oligonucleótido OsmADS8-C5b 5'-tctcctcctcctcctccacctcacct-3' (SEQ ID NO 484), 20 µM de Iniciador de oligonucleótido OsmADS8-C1b 5'-aactaaatcgcctgcaggcggaccgttttttgcgaaatgcc-3' (SEQ ID NO 485), 5 µL de amortiguador Pfu clonado 10X y 2.5 unidades de polimerasa ADN Pfuturbo en un volumen final de 50 µL. El programa de termociclización se hizo a 95° C durante 30 segundos luego a 40 ciclos de (95° C durante 10 segundos, 50° C durante 60 segundos, 72° C durante 6 minutos) luego 72° C durante 10 minutos. El

producto de ADN de 2.04 kb OsmADS8Pa clonado con el kit de clonación PCR Zero Blunt TOPO. Se identifican los recombinantes PCR-Blunt-II OsmADS8Pa al digerir 5 µL de ADN PCR-Blunt-II OsmADS8Pa miniprep con EcoRI y una mezcla de reacción 20 µL que contiene 2 µg BSA y 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% de agarosa TAE. Se secuencian los clones PCR-Blunt-II-OsmADS-8Pb positivos.

14 µL de ADN miniprep PCR-Blunt-II-TOPO-OsmADS-8Pb digiere en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 µL de Sali y 1 µL NcoI. El digerido se incuba a 37° C por más de 6 horas. El PCR-Blunt-II- TOPO-OsmADS-8Pb (Sali/NcoI) ADN se redisuelve en 1.0% de agarosa TAE y 2.96 de banda de OsmADS-8Pb (Sali/NcoI) se corta, se recubre y se precipita con etanol con un portador de glicógeno. Se recubre el ADN OsmADS-8Pb (Sali/NcoI) por microcentrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 5 µL de ddH₂O.

Se digiere 2 µg de ADN miniprep pNOV6901 en una mezcla de reacción de 20 µL que contienen 2 µg de BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 µL de NcaI y NcoI. El digerido se incuba a 37° C por más de 6 horas, luego a 70° C durante 20 minutos. Luego 1 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 µL 1 unidad/µL CIP y 8 µL ddH₂O se agregan a la reacción y esta se incuba adicionalmente a 37°C durante 30 minutos. El plásmido de ADN pNOV6901 (Sali/NcoI) se redisuelve en 1.0% de agarosa TAE y la banda de ADN de 4.7 kb

pNOV6901-OsMADS (SaliI/NcoI) se corta, se recubre y se precipita con etanol con un portador de glicógeno. El ADN del pNOV6901 (SaliI/NcoI) se recubre por microcentrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 5 μ L ddH₂O.

Se liga 4.0 μ L de OsMADS-8Pb (SaliI/NcoI) con 4.0 μ L de pNOV6901 (SaliI/NcoI) en una mezcla de reacción de 10 μ L que contiene 1 μ L de amortiguador de ligasa de ADN T4 10X y 1 μ L de ligasa de ADN T4 (400 unidades / μ L), que se incuba más de 8 horas a 16°C. 5.0 μ L de mezcla de ligación se transforma en 50 μ L de células competentes Top 10. Los recombinantes pNOV6901-OsMADS-8Pb se verifican al digerir 2 μ L de ADN miniprep 2 μ L pNOV6901-OsMADS-8Pb con 0.5 μ L de SaliI, 0.5 μ L de NcoI, y 10 μ L de mezclas de reacción que contienen 1 μ g de BSA y 1 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% agarosa TAE. Los recombinantes positivos pNOV6901-OsMADS-8Pb se secuencian.

Se introduce el sitio de restricción SbfI para el pNOV6901-OsMADS-8Pb al ligar el adaptador sintético III a la construcción. El adaptador sintético III se hace al combinar 40 μ L de 50 μ M oligonucleótido 8PA-1 5'-Pggagatcggg-3' (SEQ ID NO 486), 40 μ L de 50 μ M oligonucleótido 8PA-2 5'-Ptcgacccgatcacc-3' (SEQ ID NO 487)- en donde P es un grupo 5'-fosfato -en una mezcla de 100 μ L que es 25 mM en Tris-HCl (pH 8.0) y 10 mM en MgCl₂. La mezcla se hierve durante 5 minutos, se remueve del calor y se enfría naturalmente a temperatura ambiente (aproximadamente 60 minutos). Esto produce una mezcla de adaptador sintético III de 20 μ M

Se prepara pNOV6901-OsMADS-8Pb al digerir 14 μ L de ADN miniprep pNOV6901-OsMADS-8Pb con 2 μ L de SalI en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA y 2 μ L amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. El digerido se incuba a 37° C durante 6 horas, luego a 70° C durante 20 minutos. Luego 1 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 μ L 1 unidad/ μ L CIP y 8 μ L ddH₂O se agregan a la reacción y esta se incuba adicionalmente a 37°C durante 30 minutos. El ADN pNOV6901-OsMADS-8Pb (SalI/CIP) se redisuelve en 1% de agarosa TAE, se corta, se recubre y se precipita en etanol con portador de glicógeno. El ADN pNOV6901-OsMADS-8Pb (SalI/CIP) se recupera por microcentrifugación, se lava con 70% etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 5 μ L ddH₂O.

4.5 μ L de mezcla de adaptador sintético III se liga a 2.5 μ L de pNOV6901-OsMADS-8Pb (SalI/CIP) en una mezcla de ligación de 10 μ L que contiene 1 μ L de amortiguador de ligasa ADN T4 10X y 1 μ L T4 de ligasa T4 (400 U/ μ L), que se incuba a más de 8 horas a 16° C. 4 μ L de mezcla de ligación se transforma en 50 μ L de células de supercomponente XL-I (Stratagene, Cat. No.200236). Los recombinantes pNOV6901-OsMADS-8Pb-SbfI se verifican 7.5 μ L de ADN miniprep pNOV6901-OsMADS-8Pb-SbfI en una mezcla de reacción de 10 μ L que contiene 1 μ g BSA, 1 μ L 10X amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 1 μ L de SalI. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1.0% de agarosa TAE. Los recombinantes pNOV6901-OsMADS-8Pb-SbfI que pierden el sitio de restricción SbfI se digieren con SbfI en una mezcla de reacción de 10 μ L que contienen 1 μ g de BSA, 1 μ L de amortiguador

de endonucleasa de restricción Y SEBuffer 10X y 1 μ L SbfI (New England Biolabs). Los digeridos son incubados a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1.0% de agarosa TAE. Los recombinantes pNOV6901-OsMADS-8Pb- SbfI se secuencian.

Se digiere 2 μ g de ADN miniprep pNOV6901-OsMADS-8Pb-SbfI en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L de SbfI. El digerido se incuba a 37° C durante más de 6 horas, luego a 70° C durante 20 minutos. Luego 1 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 μ L 1 unidad/ μ L CIP y 8 μ L ddH₂O se agregan a la reacción y esta se incuba adicionalmente a 37° C durante 30 minutos. 2 μ g de ADN miniprep pCR-Blunt-II-TOPO-OsMADS-8Pa se digiere en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L SbfI. El digerido se incuba a 37° C durante más de 6 horas. .

El plásmido de ADN digerido, pNOV6901-OsMADS-8Pb-SbfI (SbfI/CIP) y pCR- Blunt-II-TOPO-OsMADS-8Pa (SbfI), se redisuelven en 1.0% de agarosa TAE y las bandas de 7.5 kb pNOV6901-OsMADS-8Pb (SbfI/CIP) y las bandas 2.4 kb OsMADS-8Pa (SbfI) se cortan, se recuperan y se precipitan en etanol con portador de glicógeno. Los fragmentos de ADN se recuperan por micro centrifugación, se lavan con 70% etanol, se secan bajo vacío y se resuspenden cada uno en 5 μ L ddH₂O.

Se liga 4.0 μ L de pNOV6901-OsMADS-8Pb (SbfI/CIP) a 4.0 μ L OsMADS-8Pa (SbfI) en una mezcla de ligación de 10 μ L que contiene

1 μ L de amortiguador de ligasa de ADN T4 10X y 1 μ L de ligasa de ADN T4 (400 U/ μ L), que se incubaba durante más de 8 horas a 16° C. 5.0 μ L de mezcla de ligación se transforma en 50 μ L de células competentes Top 10. Los recombinantes pNOV6901-OsMADS-8P se verifican al digerir 7.5 μ L de ADN miniprep pNOV6901-OsMADS-8P con 0.5 μ L SbfI, 0.5 μ L NcoI en 10 μ L de mezclas de reacción que contienen 1 μ g BSA y 1 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% de agarosa TAE. Los recombinantes pNOV6901-OsMADS-8P positivos se secuencian.

D. Construcción de la secuencia reguladora 3' OsMADS8

La secuencia reguladora 3' OsMADS-8 para el casete de expresión, cerca de 2.1 kb se produce por PCR de alta fidelidad a partir del clon PCR-Blunt II-TOPO-OsMADS8-3'-gADN anterior. La mezcla de reacción consiste de 1 μ L de ADN miniprep PCR-Blunt II-TOPO-OsMADS8-3'-gADN, 200 μ M de mezcla dNTP, 20 μ M de iniciador de oligonucleótido OsMADS8-C2 5'-acgtcccgggcgaccgagtcacatcatcatgac-3' (SEQ ID NO 488), 20 μ M de iniciador de oligonucleótido OsMADS8-C4 5'-tcgagcggccgcaggccgatgacgacaaccaataaaaac-3' (SEQ ID NO 489), 5 μ L de amortiguador clonado Pfu 10X y 2.5 unidades de polimerasa de ADN PfuTurbo (Stratagene, Cat. No. 600252) en un volumen final de 50 μ L. El programa de termociclización se hizo a 95° C durante 30 segundos luego 40 ciclos de (95° C durante 10 segundos, 50° C durante 60 segundos, 72° C durante 6 minutos) luego 72° C durante 10 minutos. El producto de ADN OsMADS-8T se recupera utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick. El ADN OsMADS-8T recuperado se precipita en etanol con portador de

glicógeno. El ADN OsmADS-8T se recupera por micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 14 μ L de ddH₂O. El ADN OsmADS-8T se digiere en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 μ L de NotI y 1 μ L de XmaI. El digerido se incuba a 37° C por más de 6 horas. El ADN OsmADS-8T (NotI/XmaI) se redissuelve en 1.0% de agarosa TAE, se corta, se recupera y se precipita en etanol con portador de glicógeno. El ADN (NotI/XmaI) OsmADS-8T se recupera por micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 5 μ L de ddH₂O. 2 μ g de de ADN miniprep pNOV6901-OsmADS-8P se digiere en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 μ L de NotI y 1 μ L de XmaI. El digerido se incuba a 37° C por más de 6 horas, luego a 70° C durante 20 minutos. Luego 1 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 μ L 1 Unidad/ μ L CIP y 8 μ L de ddH₂O se agregan a la reacción y esta se incuba adicionalmente a 37° C durante 30 minutos. El ADN de plásmido pNOV6901-OsmADS-8P (NotI/XmaI/CIP) se redissuelve en 1.0% de agarosa TAE y la banda de 9.9 kb de pNOV6901-OsmADS-8P se corta, se recupera y se precipita en etanol con portador de glicógeno. El fragmento de ADN pNOV6901-OsmADS-8P (NotI/XmaI/CP) se recupera por micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 5 μ L de ddH₂O. Se liga 4.0 μ L del pNOV6901-OsmADS-8P (NotI/XmaI/CIP) a 4.0 μ L del OsmADS-8T (NotI/XmaI) en una mezcla de ligación de 10 μ L que contiene 1 μ L de amortiguador de ligasa de ADN T4 10X y 1 μ L de ligasa ADN T4 (400 Unidades/ μ L), que se incuban más de 8 horas a 16° C. 5.0 μ L de mezcla de ligación se transforma en 50 μ L de células

competentes Top 10. Se verifican los recombinantes pNOV6901-OsMADS-8P/OsMADS-8T al digerir 2 μ L de ADN miniprep pNOV6901-OsMADS-8P/OsMADS-8T con 1.0 μ L de RsrII en mezclas de reacción de 10 μ L que contiene 1 μ g de BSA y 1 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% de agarosa TAE. Se secuencian los recombinantes positivos pNOV6901-OsMADS-8P/OsMADS-8T. El clon terminado se designa pNOV6901-OsMADS-8P/OsMADS-8T. El número QC de los plásmidos es 11170. El 11170 contiene el casete de expresión OSMADS8 completo descrito por la SEQ ID NO. 538.

E. Movilización del casete de expresión OSMADS8 GUS en pNOV6900

Se digiere 2 μ g pNOV6900 en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L de RsrII. El digerido se incuba a 37° C por más de 6 horas, luego a 70° C durante 20 minutos. Luego 1 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 μ L 1 Unidad/ μ L CIP y 8 μ L de ddH₂O se agregan a la reacción y esta se incuba adicionalmente a 37° C durante 30 minutos. 2 μ g de ADN miniprep pNOV6901-OsMADS-8P/OsMADS-8T se digiere en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L de RsrII. El digerido incuba la reacción a 37° C por más de 6 horas.

El ADN del plásmido digerido, pNOV6900 (RsrII/CIP) y pNOV6901-OsMADS-8P/OsMADS-8T (RsrII), se redisuelven en 1.0% de agarosa TAE y los 9.2 kb de pNOV6900 (RsrII/CIP) y las bandas de

9.5 kb pNOV6901-OsMADS-8P/OsMADS-8T (RsrII) se cortan, se recuperan y se precipitan en etanol con portador de glicógeno. los fragmentos de ADN pNOV6900 (RsrII/CIP) y pNOV6901-OsMADS-8P/OsMADS-8T (RsrII) se recuperan por micro centrifugación, se lavan con 70% de etanol, se secan bajo vacío y cada uno se resuspenden en 5 µL de ddH₂O.

4.0 µL de pNOV6900 (RsrII/CIP) se liga a 4.0 µL de pNOV6901-OsMADS-8P/OsMADS-8T (RsrII) en una mezcla de ligación de 10 µL que contiene 1 µL de amortiguador de ligasa de ADN T4 10X y 1 µL de ligasa ADN T4 (400 U/µL). La mezcla de ligación se incuba más de 8 horas a 16° C. 5.0 µL de mezcla de ligación se transforma en 50 µL de células competentes Top 10. Los recombinantes pNOV6900-pNOV6901-OsMADS-8P/OsMADS-8T se verifican al digerir 7.5 µL de ADN miniprep pNOV6900-pNOV6901-OsMADS-8P/OsMADS-8T con 1.0 µL de NcoI en 10 µL de mezcla de reacción de que contiene 1 µg de BSA y 1 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% de agarosa TAE. Los recombinantes pNOV6900-pNOV6901-OsMADS-8P/OsMADS-8T positivos se secuencian. El clon terminado se designa pNOV6909. El número de los plásmidos QC es 11171.

Las alteraciones construidas por ingeniería en la secuencia reguladora 5' derivada del Gen OsMADS8 incluye la introducción de un sitio SbfI seguido por un sitio RsrII en el extremo 5' del OsMADS8P, la eliminación del codón de inicio de traducción natural en OsMADS8P, la eliminación de las estructuras de lectura abiertas no deseadas en la secuencia líder no traducida 5' nueva transcrita del OsMADS 8P, la inserción de la secuencia Kozak

corriente arriba del nuevo codón de inicio de traducción en el OsMADS8P y la inserción del nuevo codón de inicio de traducción corriente arriba y corriente abajo del cruce intrón1/exón2 en OsMADS8P como un sitio NcoI. Las alteraciones construidas por ingeniería en la secuencia reguladora 3' derivada del gen OsMADS 8 incluye la introducción de un sitio NotI en el terminal 5' del OsMADS8T y la introducción de un sitio RsrII en el terminal 3' de OsMADS 8T. En esta configuración la secuencia de codificación GUS se puede reemplazar con cualquier gen de interés flanqueado por los sitios de restricción NcoI/NotI. El casete completo se inmoviliza, como un fragmento RsrII, para el vector binario pNOV6900.

El casete se transforma en Maíz a 1888 X HyII y Arroz Kaybonnet utilizando metodología mediada por agrobacterium estándar.

Expresión GUS en maíz T0

Cuarenta líneas de maíz transgénico T0 se generan. Se seleccionan histoquímicamente espiguillas para actividad GUS. Veintinueve eventos son positivos para actividad GUS. Trece también muestran expresión GUS en hojas perforadas, en general, el patrón revela actividad GUS detectable en espiguillas y poca a ninguna actividad en hojas perforadas. La mazorca de una planta que refleja este patrón se sacrifica para examinar la expresión GUS. La expresión GUS fuerte es evidente a través de la mazorca. Estos datos indican que el casete controla primariamente la expresión GUS en el tejido reproductor femenino.

La expresión GUS en arroz T0

36 líneas de arroz T0 que contienen pNOV6909, treinta y dos transformantes independientes se tiñen histoquímicamente para expresión GUS. No se detecta actividad GUS n tejido de hoja. En la mayoría de eventos la actividad localizada para panículas y se puede ver en antera o la base del carpelo. La intensidad de teñido varía significativamente

La expresión GUS en maíz T1

La progenie T1 de cuatro transformantes independientes se cultiva y analiza en detalle para la expresión GUS. Las Figuras. 14A-14D muestran que no hay expresión GUS detectable en espiguillas, tejidos de hojas, desarrollo de estigma, o retoños.

Esto indica que la expresión de la espiguilla y la hoja observada en plantas T0 puede resultar de cultivo de tejido asociado con los procesos de transformación. Órganos disecados de espiguillas T1 indican que no hay expresión GUS aparente (datos no mostrados). La figura 14D no muestra actividad GUS en el nodo adherido a la espiga de retoño que se desarrolla. El nodo por debajo de esta tampoco tiene actividad GUS detectable, pero hay distinta actividad en florecillas sobre la mazorca detenida (FIG. 14E). El casete de expresión se activa muy temprano en el desarrollo de la florecilla. Figuras 14F, 14G, 15A y 15B que muestran actividad GUS en la médula central y florecillas le desarrollo de la mazorca antes de polinización. Este patrón persiste 5 días antes de polinización a un día antes de

polinización. La expresión de médula central persiste hasta un día antes de polinización, después que la actividad GUS no se detecta más en esta zona (Figuras 15 y 16). Las Figuras 15D-15G indican algún actividad GUS en la vasculatura externa de la mazorca y el tejido que transmite la florecillas desde el día de polinización a un día después de polinización. Después de eso, la actividad GUS se detecta solo en los componentes maternos de los granos en desarrollo. Los datos mostrados en las Figuras 15 y 16 cubren el desarrollo del día 1 antes de polinización a 20 días después de polinización. La proteína GUS es detectable a través del desarrollo del óvulo y el grano, hasta 20 días después de polinización. Estos datos soportan el casete OsMADS 8 como un muy buen candidato para la expresión de rasgos en florecillas en desarrollo. Cuando se incontrolan por el casete de expresión basado en OsMADS 8, los genes que facilitan la carga del floema tal como una invertasa o un transportador de sucrosa debe probar efectividad en el soporte temprano del desarrollo de la mazorca al incrementar la fuerza de drenado. La figura 25C muestra teñido muy ligero en el tejido aéreo, sin actividad GUS en las raíces.

En resumen, la presente invención incluye los casetes de expresión basados en el gen *Oryza sativa* OsMADS 8. Este consiste del promotor de gen que incluye el primer intrón, 5'-UTR, 3'-UTR y la secuencia no transcrita 3'. El diseño del casete facilita el reemplazo de la secuencia de codificación GUS con cualquier gen de interés. El casete objetiva la expresión del gen primariamente para desarrollar florecillas y granos, y el tejido placentar por debajo de cada florecilla. Se detecta expresión post fertilización en la región hilar, aleurona, y pedicelo. El casete

debe controlar una expresión de gen a partir de un punto muy temprano en el desarrollo del óvulo, quizás después de diferenciación.

Ejemplo 6: Construcción de casete de expresión OsmADS13

A. clonación de la secuencia reguladora 5' OsmADS13

La secuencia reguladora 5' OsmADS13 del ADN genómico de arroz (gADN) se amplifica utilizando PCR de alta fidelidad. La mezcla de reacción de 50 µL consiste de 100 ng de gADN de arroz, 200 µM de dNTPs, 1 µL 20 µM de iniciador de oligonucleótido OsmADS13-C1 5'- gactgcatgctggaccgttcctcaaaattaagcacacacacatttg-3' (SEQ ID NO 490), 1 µL 20 µM de iniciador de oligonucleótido OsmADS13-C2 5'-gactccatggcttcttctgctctcaactgatcaac-3' (SEQ ID NO 491), 1 µL 10X de amortiguador de Alta Fidelidad Expand y 1 µL de polimerasa de Alta Fidelidad Expand. El programa de termociclización se hizo a 95° C durante 2 minutos seguido por 40 ciclos de (94° C durante 15 segundos, 68° C durante 7.5 minutos) seguido por 68° C durante 10 minutos. El fragmento de ADN gADN de 1.9 kb OsmADS13-5' se recupera y se precipita en etanol con portador de glicógeno. El fragmento OsmADS13-5'-gADN se recupera por micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 14 µL de ddH₂O. El fragmento de OsmADS13-5'-gADN se digiere en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 µL de NcoI. El digerido se incubaba a 37° C por más de 6 horas. El digerido se redisuelve en 1.0% de agarosa TAE y la banda de ADN (NcoI) de 1.9 kb OsmADS13-5'-gADN se corta, se recupera y se precipita en

etanol con portador de glicógeno. El ADN (NcoI) OsMADS13-5'-gADN se recupera por micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 5 μ L de ddH₂O. Se digiere de ADN miniprep 2 μ g pNOV6901 en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L de SphI. El digerido se incuba a 37° C por más de 6 horas, luego a 70° C durante 20 minutos. Luego 1 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 μ L 1 Unidad/ μ L CEP y 8 μ L de ddH₂O se agregan a la reacción y esta se incuba adicionalmente a 37° C durante 30 minutos. Se redisuelve ADN pNOV6901 (SphI/blunt) en 1.0% de agarosa TAE y 4.7 kb de banda pNOV6901 (SphI/blunt) se corta, se recupera y se precipita en etanol con portador de glicógeno. Se recupera ADN pNOV6901 (SphI/blunt) por micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 14 μ L de ddH₂O.

Se digiere de ADN miniprep pNOV6901 (SphI/blunt) en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L de NcoI. El digerido se incuba a 37° C por más de 6 horas. El ADN de plásmido pNOV6901 (SphI/blunt/NcoI) se redisuelve en 1.0% de agarosa TAE y 4.7 kb de banda pNOV6901 (SphI/blunt/NcoI) se corta, se recupera y se precipita en etanol con portador de glicógeno. El ADN de pNOV6901 (SphI/blunt/NcoI) se recupera por micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 5 μ L de ddH₂O.

Se liga 4.0 μ L OsMADS13-5'-gADN (NcoI) a 4.0 μ L de pNOV6901 (SphI/blunt/NcoI) en una mezcla de ligación de 10 μ L que contiene

1 μ L de amortiguador de ligasa de ADN T4 10X y 1 μ L de ligasa ADN T4 (400 Unidades/ μ L). La mezcla de ligación se incuba más de 8 horas a 16° C. 5.0 μ L de la mezcla de ligación se transforma en 50 μ L de células competentes Top 10. Se verifican los recombinates pNOV6901-OsMADS13P al digerir 2 μ L de de ADN miniprep pNOV6901-OsMADS13P con 0.5 μ L de XhoI, 0.5 μ L de NcoI en mezclas de reacción de 10 μ L que contiene 1 μ g de BSA y 1 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% de agarosa TAE. Se secuencian los recombinates positivos pNOV6901-OsMADS13P.

B. Clonación de la secuencia reguladora 3' OsMADS13

La secuencia reguladora 3' OsMADS13 de ADN genómico de arroz (gADN) se amplifica utilizando PCR de alta fidelidad. La mezcla de reacción de 50 μ L consiste de 100 ng de gADN de arroz, 200 μ M de dNTPs, 1 μ L 20 μ M de iniciador de oligonucleótido OsMADS13-C3 5'-tcgagcggccgctgacatggatatgatgatcag-3' (SEQ ID NO 492), 1 μ L 20 μ M de iniciador de oligonucleótido OsMADS13-C4 5'-acgtatcgatcggaccgcaacgcacgggcacccaac-3' (SEQ ID NO 493), 1 μ L de de amortiguador de Alta Fidelidad Expand y 10X 1 μ L de polimerasa de Alta Fidelidad Expand. El programa de termociclización se hizo a 95° C durante 2 minutos seguido por 40 ciclos de (94° C durante 15 segundos, 60° C durante 30 segundos, 68° C durante 6 minutos) seguido por 68° C durante 15 minutos. El fragmento de ADN de 1.2 kb OsMADS13-3'-gADN se recupera y se precipita en etanol con portador de glicógeno. El fragmento de ADN OsMADS13-3'-gADN se

recupera por micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 14 μ L de ddH₂O.

El fragmento OsmADS13-3'-gADN se digiere en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L de NotI. El digerido se incuba a 37° C por más de 6 horas luego se redisuelven en 1.0% de agarosa TAE y la banda de ADN 1.2 kb OsmADS13 -3 '-gADN (NotI) se corta, se recupera y se precipita en etanol con portador de glicógeno. Se recupera el ADN OsmADS13-3'-gADN (NotI) por micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 5 μ L de ddH₂O.

Se digiere 2 μ g de ADN miniprep pNOV6901-OsmADS13P en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 μ L de NotI y 1 μ L de SmaI. El digerido se incuba a 37° C por más de 6 horas, luego a 70° C durante 20 minutos. Luego 1 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 μ L 1 Unidad/ μ L CIP y 8 μ L de ddH₂O se agregan a la reacción y esta se incuba adicionalmente a 37° C durante 30 minutos. Se redisuelve el ADN pNOV6901-OsmADS13P (NotI/SmaI/CIP) 1.0% de agarosa TAE y la banda de 6.6 kb se corta, se recupera y se precipita en etanol con portador de glicógeno. El fragmento de ADN pNOV6901-OsmADS13P (NotI/SmaI/CIP) se recupera por micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y resuspende cada uno en 5 μ L de ddH₂O.

Se liga 4.0 μ L de pNOV6901-OsMADS13P (NotI/SmaI/CIP) a 4.0 μ L de OsMADS13-3'-gADN (NotI) en una mezcla de ligación de 10 μ L que contiene 1 μ L de amortiguador de ligasa de ADN T4 10X y 1 μ L de ligasa ADN T4 (400 Unidades/ μ L). La mezcla de ligación se incuba más de 8 horas a 16° C. 5.0 μ L de la mezcla de ligación se transforma en 50 μ L de células competentes Top 10. Se verifican los recombinantes pNOV6901-OsMADS13P/OsMADS13T al digerir 7.5 μ L de de ADN miniprep pNOV6901-OsMADS13P/OsMADS13T con 1.0 μ L de NotI en mezclas de reacción de 10 μ L que contiene 1 μ g de BSA y 1 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% de agarosa TAE. Los recombinantes PNOV6901-OSMADS13P/OSMADS13T positivos se secuencian. El clon terminado se designa pNOV6904, que también es el número QC de plásmido. El pNOV6904 contiene el casete de expresión OSMAD13 descrito por la SEQ ID NO. 539.

C. Movilización del casete de expresión OsMADS13 GUS en pNOV6900

2 μ g de pNOV6900 se digiere en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 μ L de RsrII. El digerido se incuba a 37° C por más de 6 horas, luego a 70° C durante 20 minutos. Luego 1 μ L del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 μ L 1 Unidad/ μ L CIP y 8 μ L de ddH₂O se agregan a la reacción y esta se incuba adicionalmente a 37° C durante 30 minutos. Se digiere 2 μ g de ADN miniprep pNOV6901-OsMADS13P/OsMADS13T en una mezcla de reacción de 20 μ L que contiene 2 μ g de BSA, 2 μ L de

amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 µL de RsrII. El digerido incuba la reacción a 37° C por más de 6 horas.

El ADN del plásmido digerido, pNOV6900 (RsrII/CIP) y pNOV6901-OsMADS13P/OsMADS13T (RsrII), se redisuelven en 1.0% de agarosa TAE y 9.2 kb de pNOV6900 (RsrII/CIP) y 5.3 kb de banda pNOV6901-OsMADS13P/OsMADS13T (RsrII) se cortan, se recuperan y se precipitan en etanol con portador de glicógeno. Los fragmentos de ADN pNOV6900 (RsrII/CIP) y pNOV6901-OsMADS13P/OsMADS13T (RsrII) se recuperan por micro centrifugación, se lavan con 70% de etanol, se secan bajo vacío y resuspenden cada uno en 5 µL de ddH₂O.

4.0 µL de pNOV6900 (RsrII/CIP) se ligan a 4.0 µL pNOV6901-OsMADS13P/OsMADS13T (RsrII) en una mezcla de ligación de 10 µL que contiene 1 µL de amortiguador de ligasa de ADN T4 10X y 1 µL de ligasa de ADN T4 (400 U/µL). La mezcla de ligación se incuba más de 8 horas a 16° C. 5.0 µL de mezcla de ligación se transforma en 50 µL de células competentes TOP 10. Los recombinantes pNOV6900-pNOV6901-OsMADS13P/OsMADS13T se verifican al digerir 7.5 µL de ADN miniprep pNOV6900-pNOV6901-OsMADS13P/OsMADS13T con 1.0 µL de NcoI en mezclas de reacción de 10 µL que contiene 1 µg de BSA y 1 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% de agarosa TAE. Los recombinantes positivos pNOV6900-pNOV6901-OsMADS13P/OsMADS13T se secuencian. El clon terminado se designa pNOV6905, que también es el número QC de plásmido.

Las alteraciones construidas por ingeniería en la secuencia reguladora del gen 5' derivada del gen OsmADS13, incluye la introducción de un sitio RsrII en el extremo 5' del OsmADS13P, la inserción de la secuencia Kozak corriente arriba del codón de inicio de traducción OsmADS13P natural y la modificación del codón de inicio de traducción OsmADS13P natural de tal forma que este está contenido dentro de un sitio NcoI. Las alteraciones construidas por ingeniería en la secuencia reguladora del gen 3' derivada del gen OsmADS13 incluye la introducción del sitio NotI en el terminal 5' del OsmADS13T y la introducción del sitio RsrII en el terminal 3' del OsmADS13T. En esta configuración la secuencia que codifica el GUS se puede reemplazar con cualquier gen de interés flanquearon por los sitios de restricción NcoI/NotI. El casete completo se moviliza, como un fragmento RsrII, al vector binario pNOV6900.

El casete se transforma en maíz A188X HyII y arroz Kaybonnet utilizando metodología mediada por agrobacterium estándar.

Expresión GUS en maíz T0.

Sesenta y siete líneas de maíz transgénico T0 se generan. Se seleccionan histoquímicamente espiguillas para expresión GUS. Cincuenta y seis fueron positivas para actividad GUS. Treinta y cinco también mostraron expresión GUS en hojas perforadas. Diez líneas no tuvieron actividad GUS detectable en espiguillas u hojas perforadas.

Dos líneas T0 se seleccionan para analizar expresión GUS en el desarrollo de espigas. Ambas líneas tienen una señal GUS en espiguillas y no tienen señal GUS en hojas perforadas. Las espigas se cosechan aproximadamente siete días antes de la aparición de estigmas y se tiñen histoquímicamente para expresión GUS. Las secciones completas mostraron una fuerte señal GUS solo en el desarrollo de florecillas, mientras que la actividad GUS estuvo ausente en el tejido que bordea la mazorca. Estos datos indican que las funciones del casete de expresión OsMADS13 controla la expresión GUS en ambas espiguillas macho y hembra en transformantes de maíz T0.

Expresión GUS en arroz T0.

Treinta y tres líneas de arroz T0 se producen. Catorce transformantes independientes se tiñen histoquímicamente para expresión GUS, actividad GUS se detecta primariamente en espiguillas. Algunas plantas también tienen actividad GUS en tejido de hojas.

Expresión GUS en maíz T1

La progenie T1 de los tres transformantes independientes se cultiva y analizan en detalle para expresión GUS. Las figuras 20A-20C y las figuras 21A-21C muestran que no hay expresión GUS detectable en tejido de hoja, que desarrolla estigmas o espiguillas. Esto indica que la expresión de espiguilla observada en plantas T0 puede resultar del cultivo de tejido asociado con los procesos de transformación. Órganos disecados de espiguillas

T1 indican que no hay expresión GUS aparente (datos no mostrados). Las figuras 20D y 20E muestran actividad GUS en el desarrollo de la mazorca cosechada cerca de cinco días antes de polinización. La sección longitudinal muestra expresión localizada para desarrollar óvulos y transmitirlos o tejido de placenta. La sección cruzada soporta esto y suministra evidencia adicional para la expresión en la vasculatura de mazorca. La figura 21 resume la expresión GUS observada en un segundo evento transgénico. Este también localiza zonas en donde los óvulos probablemente se desarrollaran. La figura 22 demuestra que la expresión localiza la vasculatura para el suministro del desarrollo de mazorca.

Estos datos soportan el casete OsMADS13 como un muy buen candidato para la expresión de rasgos en óvulos que se desarrollan. Cuando se controlan por el casete de expresión basado en OsMADS13, los genes que facilitan la carga de floema tal como invertasa o un transportador de sucrosa deben probar efectividad en soportar el desarrollo de mazorca al incrementar la fuerza de drenaje.

Las figuras 23 y 24 demuestran que el casete continúa para función post-fertilización. El patrón de expresión GUS observado en cuatro y seis después de polinización (figura 23). La expresión GUS de desarrollo de grano (21 días después de polinización) permanece localizada en el pedicelo y las regiones hilares (figura 24). También aparece en la aleurona. La prt proteína GUS es detectable a través del óvulo y el desarrollo del grano, hasta 21 días después de polinización. La figura 25D

muestra teñido muy ligero en el tejido aéreo, sin actividad GUS en las raíces.

La presente invención incluye un casete de expresión basado en el gen de *Oryza sativa* OsMADS13. El casete de expresión incluye el promotor de gen, que incluye el primer intrón y la secuencia 3' no transcrita 5'-UTR, y 3'UTR. Estos componentes se ensamblan dentro del casete de expresión GUS y se prueban en plantas transgénicas. El diseño del casete facilita el reemplazo de la secuencia de codificación GUS con cualquier gen de interés.

El casete expresará el gen objetivo a la vasculatura dentro del tejido de placenta por debajo de la florecilla de la mazorca que se desarrolla. La expresión post-fertilización también se espera en la región hilar y aleurona y el pedicelo. El casete debe controlar la expresión de gen desde un punto muy temprano, más de 7 días antes de polinización, en desarrollo de óvulo.

Ejemplo 7: Identificación de las secuencias cADN OsT6PP

Se clonan los primeros genes de fosfatasa trehalosa-6-fosfato de planta vascular de *Arabidopsis thaliana* por complementación de un mutante de eliminación *tps2* de almidón (Vogel et al. 1998). Los genes designados AtTPPA y AtTPPB (GenBank accessions AF007778 y AF007779) en donde se muestran en ese tiempo que tienen actividad fosfatasa trehalosa-6-fosfato. Las secuencias de proteína AtTPPA y AtTPPB se utilizan en queries TBLASTN de bases de datos de secuencias de arroz y maíz. Las alineaciones de secuencia organizan los éxitos en genes individuales. Se identifican tres homólogos de maíz y tres de

arroz T6PP. Las secuencias de cADN que corresponden a la secuencia de proteína predicha para cada gen ZmT6PP-1, -2 y -3 y OsT6PP-1, -2 y -3- se muestran en alineación global con el Arabidopsis T6PPs en la figura 26.

La composición y el método de la presente invención incluyen la utilización del promotor OsmADS6 ligado operablemente a una molécula de ácido nucleico que cuando se expresa en una célula de planta, incrementa la expresión del T6PP. Al hacerlo así, el flujo a través de la trayectoria de trehalosa se incrementa solo en mazorcas de desarrollo joven en donde estas funcionan para incrementar el flujo a través de metabolismo de carbono central.

La secuencia de cADN OsT6PP-3 (SEQ ID NO. 531) se amplifica utilizando PCR de alta fidelidad. La mezcla de reacción de 50 µL consiste de un 1 µL de librería cADN de arroz (preparado de mRNA de callo en Vector Lambda Unizap de Stratagene, tamaño de librería primario $>1 \times 10^6$ pfu, título de librería amplificado $>1 \times 10^{12}$ pfu/mL), 200 µM dNTPs, 1 µL 20 µM de iniciador de oligonucleótido T6PP-EC-5 (5'-catggaccatggatttgagcaatagctcac-3') SEQ ID NO. 528 y 1 µL 20 µM de iniciador de oligonucleótido T6PP-EC-3 (5'-atcgagagctcacactgagtgccttcttcc-3') SEQ ID NO. 529, 5 µL de amortiguador clonado PFU 10X y 2.5 Unidades de polimerasa de ADN PfuTurbo. El programa de termociclización es de 95° C durante 2 minutos seguido por 40 ciclos de (94° C durante 15 segundos, 50° C durante 1 minuto, 72° C durante 1 minuto) seguido por 72° C durante 10 minutos. El producto OsT6PP-3 se clona co el kit de clonación PCR Zero Blunt TOPO. Se identifica el pCR-Blunt-II-TOPO-OsT6PP-3 al digerir 5 µL de ADN de miniprep pCR-Blunt-II-

TOPO-OsT6PP-3 con EcoRI en una reacción de 20 µL que contiene de 2 µg de BSA y 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción EcoRI 10X. La reacción se incubaba a 37° C durante 2 horas y los productos PCR-Blunt-II-TOPO-OsT6PP-3 (EcoRI) se redisuelven en 1% de agarosa TAE. El clon PCR-Blunt-II-TOPO-OsT6PP-3 se secuencía. El cADN OsT6PP-3 se flanquea por sitios de endonucleasa de restricción NcoI/SacI.

Para facilitar la clonación en 11082, un sitio NcoI interno OsT6PP se silencia utilizando el kit de Mutagénesis Dirigida a Multi Sitio QuikChange de Stratagene y el iniciador de oligonucleótido T6PP-QC (5'-CTTTATTATGCTGGAAGTCATGGTATGGACATAATGGCACC-3') SEQ ID NO. 530.

Ejemplo 8: Construcción de OsmADS6-T6PP

A. Construcción de casete de expresión OsmADS6-OsT6PP-3

Se digiere el ADN (14 µL) de clon PCR-Blunt-II-TOPO-OsT6PP-3 en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 µL NcoI y 1 µL de SacI. El digerido se incubaba a 37° C durante por más de 6 horas. Se redisuelve ADN (NcoI/SacI) PCR-Blunt-II-TOPO-OsT6PP-3 en 1.0% de agarosa TAE y se corta la banda (NcoI/SacI) de 1.3 kb OsT6PP-3, se recupera y se precipita en etanol con portador de glicógeno. Se recupera el ADN (NcoI/SacI) OsT6PP-3 por micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 5 µL de ddH₂O.

Se digiere 2 µg de ADN miniprep 11082 en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X, 1 µL de NcoI y 1 µL SacI. El digerido se incuba a 37° C por más de 6 horas, luego a 70° C durante 20 minutos. Luego 1 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 µL 1 Unidad/µL CIP y 8 µL de ddH₂O se agregan a la reacción y esta se incuba adicionalmente a 37° C durante 30 minutos. El ADN (NcoI/SacI/CIP) 11082 se redisuelve en 1.0% de agarosa TAE y 8.1 kb de banda (NcoI/SacI/CIP) 11082 se corta, se recupera y se precipita en etanol. Se recupera el fragmento de ADN (NcoI/SacI/CIP) 11082 por micro centrifugación, se lava con 70% d etanol, se seca bajo vacío y se resuspende en 5 µL de ddH₂O.

Se liga 4.0 µL 11082 (NcoI/SacI/CIP) a 4.0 µL de OsT6PP-3 (NcoI/SacI) en una mezcla de reacción de 10 µL que contiene 1 µL amortiguador de ligasa ADN T4 10X y 1 µL de Ligasa ADN T4 (400 Unidades/µL). La mezcla de reacción se incuba más de 8 horas a 16° C. 5.0 µL de mezcla de ligación se transforma en 50 µL de células competentes Top10. Los recombinantes se verifican al digerir 7.5 µL de ADN miniprep 11082-OsT6PP-3 con 1.0 µL de RsrII en 10 µL de mezclas de reacción que contienen 1 µg de BSA y 1 µL amortiguador de endonucleasa de restricción. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% de agarosa TAE. Los recombinantes positivos 11082-OsT6PP-3 se secuencian. El vector se designa OsMADS6-OsT6PP-Assembly y se muestran en la figura 27 A.

B. Movilización del casete de expresión OsMADS6-OsT6PP-Assembly en pNOV6900

Se digieren 2 µg de pNOV6900 en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 µL de RsrII. El digerido se incuba a 37° C por más de 6 horas, luego a 70° C durante 20 minutos. Luego 1 µL del amortiguador de endonucleasa de restricción 10X apropiado, 1 µL 1 Unidad/µL CIP y 8 µL de ddH₂O luego se agrega a la reacción y esta se incuba adicionalmente a 37° C durante 30 minutos. Se digiere 2 µg de ADN miniprep pNOV6906-OsT6PP-Assembly en una mezcla de reacción de 20 µL que contiene 2 µg de BSA, 2 µL de amortiguador de endonucleasa de restricción 10X y 2 µL de RsrII. El digerido se incuba a 37° C durante más de 6 horas.

Se redisuelve ADN de plásmido pNOV6900 (RsrII/CIP) y pNOV6906-OsT6PP-Assembly (RsrII) en 1.0% de agarosa TAE, y 9.2 kb de pNOV6900 y se cortan las bandas (RsrII/CIP) de 6.8 kb pNOV6906-OsT6PP-Assembly (RsrII) se recuperan y se precipitan en etanol con portador de glicógeno. Se recuperan los fragmentos de ADN pNOV6900 (RsrII/CIP) y fragmentos de ADN pNOV6906-OsT6PP-Assembly (RsrII) por micro centrifugación, se lava con 70% de etanol, se secan bajo vacío y se resuspenden en 5 µL de ddH₂O cada uno.

Se liga 4.0 µL de pNOV6900 (RsrII/CIP) a 4.0 µL de pNOV6906-OsT6PP-Assembly (RsrII) en una mezcla de ligación de 10 µL que contiene 1 µL de amortiguador de ligasa de ADN T4 10X y 1 µL de ligasa ADN T4 (400 U/µL). La mezcla de ligación se incuba más de

8 horas a 16° C. 5.0 µL de mezcla de ligación se transforma en 50 µL de células competentes Top 10. Se verifican los recombinantes pNOV6900-pNOV6906-OsT6PP-Assembly al digerir 7.5 µL de ADN miniprep con 1.0 µL NcoI en mezclas de reacción de 10 µL que contienen 1 µg de BSA y 1 µL amortiguador de endonucleasa de restricción. Los digeridos se incuban a 37° C durante 2 horas luego se redisuelven en 1% de agarosa TAE. Se secuencian los recombinantes positivos pNOV6900-pNOV6906-OsT6PP-Assembly. El clon terminado se designa OsmADS6-OsT6PP-Binario y se muestra en la figura 27B. El número QC de plásmido es 12194.

El casete de expresión OsmADS6-OsT6PP-3 (SEQ ID NO. 533) se transforma en maíz A188 utilizando metodología mediada por agrobacterium estándar. Retoños T0 regenerados se seleccionan para número de copia de transgen se insertan íntegramente utilizando un ensayo Taqman™. Los eventos que contienen una copia sencilla del casete de expresión OsmADS6-OsT6PP-3 y no otra secuencia derivada del vector binario se identifican.

Función de casete de expresión en cada Evento transgénico se verifica por RT-PCR. La plantilla de ARN total libre de ADN se prepara de 100 mg de tejido de mazorca T0 utilizando el kit RNeasy Plant. El ensayo de RT-PCR se desarrolla utilizando el kit Qiagen One Step RT-PCR con 100 ng de plantilla de ARN total. Los T6PP-RTPCRF (5'-gacagaactgacgaagacgctttcaa-3') y 6906-tr (5'-ctccaacttctgacagctg-3') iniciadores (SEQ ID NOS. 534, 535 respectivamente). Este ensayo produce un fragmento bp transgen-específico 210.

Ejemplo 9: Condiciones de Crecimiento en Invernadero

Semillas de maíz se cultivan en tazas de 2.5 SVD (Classic 600, contenedores nodriza de ~ 2 galones) en mezcla universal (Sungrow Horticulture, Pine Bluff, AR). La mezcla universal es 45% serrín de turba, 45% de corteza, 5% de perlita, 5% vermiculita. Las condiciones ambientales para el cultivo de maíz en invernadero son típicamente de 16 horas diarias (intensidad de luz promedio $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$), temperatura de día de 80-86° F, temperatura noche 70-76° F y humedad relativa mayor del 50%. Las plantas se colocan en plataformas de 2" para evitar contacto con el piso del invernadero. Las plantas se rocían a mano hasta que se requiera irrigación, luego ellas se colocan en irrigación por goteo. El horario de irrigación es de 4 minutos cada tercer día. Las plantas se tratan rutinariamente con insecticidas para controlar pestes.

Ejemplo 10: Evaluación de maíz transgénico que expresa OsmADS6-OsT6PP-3 en invernadero.

La evaluación de invernadero es un experimento de resistencia al agua controlado que cuantifica la viabilidad de los óvulos en plantas no tensionadas y tensionadas por agua. Los datos de plantas no tensionadas representan el potencial del genotipo bajo un conjunto de semillas bajo condiciones ideales. Los datos de plantas tensionadas con agua cuantifica la absorción de grano que resulta de la sequía al tiempo de la florescencia. Los resultados de estos experimentos se pueden predecir o

desempeñar en campo. Utilizamos esta herramienta para seleccionar eventos transgénicos para evaluaciones de campo.

La segregación de maíz transgénico para una copia sencilla del transgen OsMADS6-OsT6PP-3 se cosecha como se realizó anteriormente. Se utiliza análisis Taqman para dividir la progenie en homocigotos o hemicigotos (que contienen OsMADS6-OsT6PP-3) y acigotos (los grupos perdidos OsMADS6-OsT6PP-3). Estos individuos se polinizan con polen de maíz JHAF031 para generar semillas híbridas (KPOO188RA x JHAF031) para el experimento de invernadero. La semilla híbrida se cultiva como se cultiva anteriormente. Se transfieren plántulas a 600 tasas, como se hizo anteriormente, y se mantienen utilizando procedimientos de invernadero estándar hasta que ellas alcanzan una etapa de crecimiento V6 (Ritchie et al., 1997). Todas las plantas se trata con pesticida sistémico, maratón, para reducir la susceptibilidad a pestes. La tensión al agua se impone gradualmente, utilizando sal, como el osmótico (Nuccio et al. 1998). La sal consiste de cloruro de sodio/cloruro de calcio en una proporción de 10:1 molar, suministrado en 05X de solución Hoagland, para evitar la interrupción inducida por el sodio de la toma de potasio. La concentración de sal en el irrigante se incrementa de 50mM a 100mM a 150mM cada tres días para dar tiempo a las plantas de ajustarse a la sal. Las plantas se mantienen en 150mM en solución de sal a través del período de fluorescencia. Típicamente dos semanas, después del cual se lavan vigorosamente con agua las materas y las plantas se retornan a irrigación normal. Este protocolo se reduce típicamente el conjunto de grano al 40-60%, comparado con las plantas de control que no reciben sal.

Típicamente 15-20 semillas por evento transgénico se cultivan para generar una población de plántulas uniformes. Las plantas se disponen en un diseño de bloque aleatorio completo que consiste de 6-8 réplicas por tratamiento. El desarrollo de las espigas se cubre con bolsas de polinización antes de la emergencia de la estigma. Se registran las fechas de emergencia de estigma y cubierta para polen y las mazorcas individuales se manejan polinizadas con polen donante 5 días después de la emergencia del estigma. Las bolsas de polinización se remueven después de completar todas las polinizaciones. Las espigas se cosechan 30 días después de polinizaciones, y se secan durante 4 días a contenido de humedad del 15%. Las espigas se cubren y los granos se cuentan y pesan.

Ejemplo 11: Experimento de invernadero.

Se estudian dos eventos OsmADS6-T6PP-3 por su capacidad de ajustar semillas bajo tensión de agua. Veinticuatro Semillas híbridas (A188 x JHAF031) de cada evento se germinan. Se utiliza análisis Taqman para estabilizar cigocidad en cada plántula. Los hemocigotos y acigotos utilizando el protocolo de tensión de agua de invernadero descrito anteriormente. En este experimento, las plantas acigotas sirven como el método de prueba. En estos experimentos de invernadero, las plantas hemocigotas pueden no ser distinguidas de las plantas acigotas. Sobre el promedio la tensión del agua reduce el conjunto de grano al 42%. Los datos en estos experimentos de invernadero indican que el casete de expresión OsmADS6-T6PP-3 no influencia el conjunto de granos en

maíz de estos experimentos de invernadero particulares y cuando se evalúan por los anteriores de protocolos de tensiones de agua anteriores.

Ejemplo 12: Evaluación de OsmADS6-T6PP-3 que expresa maíz transgénico para tolerancia de tensión a la sequía en el campo.

Se generan semillas híbridas para cada evento transgénico en la estación de campo de semillas Syngenta en Kauai a finales del 2004. La semilla T1 obtenida por autopolinizar la planta T0 de los eventos que se cultivan en cuatro tasas de filas sencillas, 12.7 pies de largo separadas por callejones de 3 pies con cerca de 20 plantas por fila. Se utiliza análisis Taqman para dividir la progenie en homocigotos o hemicigotos (que contienen OsmADS6-T6PP-3) y grupos acigotos (el OsmADS6-T6PP-3 perdidos). En dos de los lotes de fila sencilla se destruyen plantas hemicigotas y acigotas y las plantas homocigotas se autopolinizan por semillas en masa y también cruzadas de ensayo para NP20432BT11 y NP2044BT11. En los otros dos lotes de filas sencillas se destruyen plantas homocigotas y hemicigotas y las plantas acigotas se autopolinizan y también se cruzan con NP2043BT11 y NP2044BT11. Las semillas de cruce de ensayo acigota y hemicigota se utilizan para conducir ensayos de campo.

Se conduce una evaluación de campo para probar el desempeño del transgen en un experimento de sequía controlada. El experimento se conduce en las instalaciones de protección de cultivos de Syngenta en Visalia, California en el verano de 2004. El sitio de plantación tiene típicamente menos de 3 pulgadas de

agua lluvia durante el verano. La semilla de cruce de ensayo NP2043BT11 generada anteriormente, se utiliza en este estudio. Esta población también contiene el transgen BT para controlar la presión de insectos. Un diseño de bloque dividido con régimen de agua según los lotes principales dispuestos en bloques completos aleatorizados y se replica tres veces, los eventos como los sublotes, y en casos en donde existan semillas de híbridos acigotos y hemicigotos, se utiliza genotipo como sublotes. Dos regímenes de agua se procura: Tensionado por agua y bien humectado. Cada lote consiste de dos filas, 17.5 pies de largo plantados con 40 semillas por fila. Los callejones entre rangos fue de 2.5 pies. Se utilizan surcos de irrigación para llevar agua a los campos. Cada bloque de tratamiento tiene una fuente de irrigación dedicada situada a un extremo del campo. La replicación se dispone en tal una forma que la replicación uno fue más cercana y la replicación tres fue la más lejana de la fuente de irrigación. Después de emergencia, se toman conteos y los lotes se adelgazan según sea necesario para establecer la uniformidad del campo.

El bloque bien humectado se piensa que ha sido irrigado óptimamente a través del experimento. El bloque de tensión de agua se humecta óptimamente hasta que las plantas alcanzan aproximadamente V, en el que el tiempo de agua se mantiene. Las plantas se regresan a la irrigación óptima después de 90% de emergencia.

Después de que las plantas hacen transición al desarrollo reproductivo, el 50% de la cubierta de polen, se registra la

fecha de 50% de cubrimiento de polen, la fecha de 50% de emergencia de estigma, y el enrollamiento de hoja a florescencia temprana, media y tardía para cada lote, los lotes aparecen tres semanas después de que aparecen los estigmas.

Los lotes se combinan-cosechan y la producción de grano y humedad de grano se registra. Los datos de los lotes hemicigotos se comparan con los lotes acigotos, o lotes tipo silvestre en donde sean necesarios, para calibrar el efecto del transgen sobre la producción. Los resultados para siete eventos OsmADS6-T6PP-3 se muestran en la Figura 28. Los datos muestran que el transgen OsmADS6-T6PP-3 tiene un efecto positivo sobre la producción en cuatro de los siete eventos. La ganancia de producción es evidente en ambos lotes no tensionados y tensionados por sequía. Por ejemplo, en el bloque de tratamiento tensionado con sequía la producción promedio para los eventos 5217 que contienen el transgen 73 Bu/Acre y la producción promedio para los eventos 5217 que les falta el transgen fue de 54 Bu/Acre. Los resultados sugieren que el transgen mejora el conjunto de grano al 25% en condiciones de tensión de sequía. En el bloque de tratamiento menos tensionado el producto promedio para los eventos 5217 que contienen el transgen fue de 132 Bu/Acre y el producto promedio para los eventos 5217 que le falta el transgen fue de 95 Bu/Acre. Los resultados sugieren que el transgen mejora el conjunto de grano de cerca del 28% en plantas menos tensionadas. El producto promedio calculado para cada lote en el bloque de tratamiento tensionado por sequía fue de 72 Bu/Acre. El producto promedio calculado para cada lote en el bloque de tratamiento menos tensionado fue de 113 Bu/Acre. La mejora de producto debido al

gen OsMADS6-T6PP-3 varía de evento a evento. Esto se observa en cuatro de los siete eventos ensayados y se manifiesta en ambas plantas tensionadas por sequía y menos tensionada. Los resultados de este experimento de campo demuestran la efectividad del transgen OsMADS6-T6PP-3 en la estabilización del conjunto de grano en maíz tensionado por sequía.

Ejemplo 13: Evaluación de maíz transgénico que expresa OsMADS6-T6PP-3 para producto en campo.

Se generan semillas híbridas para cada evento transgénico en la estación de campo de semillas de Syngenta en Kauai a finales de 2004. La semilla T1 obtenido por autopolinización de la planta T0 de los eventos se cultiva en cuatro lotes de filas sencillas, 12.7 pies de largo separadas por callejones de tres pies con aproximadamente 20 plantas por fila. Se utiliza análisis Taqman para dividir la progenie en los grupos homocigotos o hemicigotos (que contienen OsMADS6-T6PP-3) y grupos acigotos (el OsMADS6-T6PP-3 perdidos). En dos lotes de filas únicas, las plantas homocigotas y acigotas se destruyen y las plantas homocigotas se autopolinizan por semillas en masa también cruzadas por ensayo para NP2043BT11 y NP2044BT. En los otros dos lotes de filas únicas las plantas homocigotas y hemicigotas se destruyen y las plantas acigotas se autopolinizan y también se cruzan con NP2043BT11 y NP2044BT11. Las semillas de cruces de ensayo acigoto y hemicigoto de los eventos se utilizan para conducir ensayos de campo. Una serie de ensayos de producto se conducen en varias ubicaciones del medio oeste para probar desempeño de transgen bajo condiciones típicamente utilizadas por cultivadores. El

material XPOO188 x JHAF431B, generado anteriormente, se utiliza en las últimas zonas de madurez y el material XPOO x JHAF431B generado anteriormente, se utiliza en las zonas cercanas a la madurez. Estas poblaciones también contienen el transgen DT para control de presión de insectos. El diseño experimental consiste de bloques completos aleatorizados con tres replicaciones. Cada unidad experimental consiste de dos filas de lotes, 17.5 pies de largo plantadas con 34 granos por fila. Los rangos se separan por callejones de tres pies. Los eventos para los cuales hubo semillas de ambos híbridos acigotos y hemicigotos, se restringe la aleatorización para mantener los híbridos acigotos y hemicigotos de los eventos en los lotes vecinos. La mayoría de eventos se evalúan en ocho a nueve ubicaciones. El evento 5124 se evalúa en tres ubicaciones. Después de emergencia se toman conteos y los lotes se adelgazan según sea necesario para estabilizar la uniformidad de campo. Durante el crecimiento de lotes de estación se evalúan para encamado de raíz, "greensnap", las unidades de calor 50% de protección de polen y unidades de calor a 50% de formación de estigma.

Los lotes se combinan-cosechan y el producto de grano y la humedad de grano se registran. Los datos de los lotes hemocigotos se comparan con lotes acigotos, o lotes tipo silvestre según sea necesario, para calibrar el efecto del transgen sobre producto. Los datos muestran que el transgen OsMADS6-T6PP-3 no afecta significativamente el producto en este experimento. Hay dos factores para considerar. Primero la desviación estándar para el producto de grano en este experimento fue de 15-20% de la media. Esto no es inusual. Segundo, las condiciones de crecimiento en el

medio oeste fueron ideales para el maíz en 2004. Dependiendo de la ubicación de los productos en este experimento promediado de 90 a 130 Bu/Acre. Los resultados de este experimento de campo indican que el transgen OsMADS6-T6PP-3 no origina resistencia de producto.

Ejemplo 14: Transformación

Una vez se ha clonado una secuencia de ácido nucleico de la invención en un sistema de expresión, este se transforma en una célula de planta. Los casete de expresión objetivo y receptor de la presente invención se pueden introducir en la célula de planta en un número de formas reconocidas en la técnica.

Los métodos para la regeneración de plantas también son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, Los vectores de plásmido T1 se han utilizado para el suministro de ADN externo, así como también la toma de ADN directo por vía de electroporación, microinyección, y microproyectiles. Adicionalmente, las bacterias del género agrobacterium se pueden utilizar para transformar células de plantas. Adelante hay descripciones de técnicas representativas para transformar plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas y así como también una técnica de transformación de plástido representativa.

A. Transformación de Dicotiledones.

Las técnicas de transformación para dicotiledóneas son bien conocidas en la técnica e incluyen técnicas basadas en

Agrobacterium y técnicas que no requieren *Agrobacterium*. Las técnicas que no requieren *Agrobacterium* involucran la toma de material genético exógeno directamente por protoplastos o células. Esta se puede acompañar por TEG o toma mediada por electroporación, suministro mediado por bombardeo de partículas o por microinyección. Ejemplos de estas técnicas se describen por Paszkowski et al, EMBO J 3: 2717-2722 (1984), Potrykus et al., Mol. Gen. Genet. 199:169-177 (1985), Reich et al., Biotechnology 4: 1001-1004 (1986), y Klein et al., Nature 327: 70-73 (1987). En cada caso las células transformadas se regeneran a plantas completas utilizando técnicas estándar conocidas en el arte.

La transformación mediada por *Agrobacterium* es una técnica preferida para la transformación dicotiledóneas debido a su alta eficiencia de transformación y a su amplia utilidad con muchas especies diferentes. La transformación por *agrobacterium* involucra típicamente la transferencia del vector binario que lleva el ADN externo de interés (por ejemplo pCIB200 p pCIB2001) para una cepa de *agrobacterium* apropiada que puede depender del complemento de los genes vir llevados por la cepa *agrobacterium* huésped ya sea en un plásmido T1 co residente o cromosomalmente (por ejemplo cepa CIB542 por pCIB200 y PCIB2001 (Uknes et al. Plant Cell 5: 159-169 (1993))). La transferencia del vector binario recombinante a *agrobacterium* se acompaña por un procedimiento triparental utilizando *E. coli* que lleva el vector binario recombinante, un auxiliar de cepa *E.coli* que lleva un plásmido tal como el pRK2013 y que es capaz de movilizar el vector binario recombinante a la cepa objetivo *agrobacterium*. Alternativamente, el vector binario recombinante se puede

transferir a agrobacterium por transformación de ADN (Höfgen & Willmitzer, Nucl. Acids Res. 16: 9877 (1988)).

La transformación de las especies de planta objetivas por agrobacterium recombinante usualmente involucra el cocultivo del agrobacterium con explantes de la planta y seguir el protocolo conocido en la técnica. El tejido transformado se regenera en medio seleccionable que lleva el marcador de resistencia herbicida presente entre los límites de T-ADN de plásmido binario.

Otra aproximación para transformar células de plantas con un gen involucra propulsar partículas activas biológicamente o inertes en tejidos de plantas y células. Esta técnica se describe en las patentes U.S. No. 4,945,050, 5,036,006, y 5,100,792 todas de Sanford et al. Generalmente, este procedimiento involucra propulsar partículas activas biológicamente o inertes en las células bajo condiciones efectivas para penetrar la superficie externa de la célula y producir la incorporación dentro del interior de esta. Cuando las partículas inertes se utilizan, el vector se puede introducir dentro de la célula al recubrir las partículas con el vector que contiene el gen deseado. Alternativamente, la célula objetivo se puede redondear por el vector de tal forma que el vector se lleve dentro de la célula por la estela de la partícula. Las partículas biológicamente activas (por ejemplo, célula de almidón seca, bacteria secas o un bacteriófago, cada uno contiene ADN que se busca introducir) también se puede propulsar dentro del tejido de la célula en la planta.

(B) Transformación de monocotiledones

La transformación de la mayoría de las especies monocotiledóneas también se ha vuelto ahora rutina. Las técnicas preferidas incluyen transferencia de genes directos dentro de protoplasto utilizando técnicas de electroporación o PEG, y bombardeo de partículas dentro del tejido de callo. Las transformaciones se pueden tomar con una especie de ADN único o especies de ADN múltiples (es decir cotransformación) y ambas de estas técnicas son adecuadas para uso con esta invención. La cotransformación puede tener la ventaja de evitar la construcción del vector completo y de generar plantas transgénicas con lugares no ligados para el gen de interés y los marcadores seleccionables, permitiendo la remoción de marcadores seleccionables en generaciones posteriores, que debe ser deseable. Sin embargo, una ventaja del uso de cotransformación es la frecuencia del menos del 100% con las especies de ADN separadas que se integran en el genoma (Schocher et al. *Biotechnology* 4: 1093-1096 (1986)).

Las solicitudes de patente EP 0 292 435, EP 0 392 225, y WO 93/07278 describen técnicas para la preparación del callo y protoplastos a partir de una línea cultivada elite de maíz, la transformación de protoplastos utilizando electroporación o PEG, y la regeneración de plantas de maíz a partir de protoplastos transformados. Gordon-Kamm et al. (*Plant Cell* 2: 603-618 (1990)) y Fromm et al. (*Biotechnology* 8: 833-839 (1990)) han publicado técnicas para la transformación de líneas de maíz delgadas A188

utilizando bombardeo de partículas. Adicionalmente, la WO 93/07278 y Koziel et al. (Biotechnology 11,: 194-200 (1993)) describe técnicas para la transformación de líneas cultivadas elite de maíz por bombardeo de partículas. Esta técnica utiliza embriones de maíz inmaduros de 1.5-2.5 mm de longitud cortadas de una espiga de maíz de 14-15 días después polinización y un dispositivo PBS-1000He Biolistics para bombardeo.

También se puede tomar la transformación del arroz por técnicas de transferencia de gen directa, utilizando protoplastos o bombardeo de partículas. La transformación mediada por protoplastos se ha descrito para los tipos *Japonica* y tipos *Indica* (Zhang et al. Plant Cell Rep 7: 379-384 (1988); Shimamoto et al. Nature 338: 274-277 (1989); Datta et al. Biotechnology 8: 736-740 (1990)). Ambos tipos también son transformables rutinariamente utilizando la técnica de bombardeo de partículas (Christou et al. Biotechnology 9: 957-962 (1991)). Adicionalmente, la WO 93/21335 describe técnicas para la transformación de arroz por vía de electroporación.

La solicitud de patente EP 0 332 581 describe técnicas para la generación, transformación y regeneración de protoplastos Pooideae. Estas técnicas permiten la transformación de *Dactylis* y trigo. Adicionalmente, la transformación del trigo se ha descrito por Vasil et al. (Biotechnology 10): 667-674 (1992)) utilizando bombardeo de partícula dentro de las células de callo regenerable a largo plazo tipo C, y también por Vasil et al. (Biotechnology 11: 1553-1558 (1993)) y Weeks et al. (Plant Physiol. 102: 1077-1084 (1993)) utilizando bombardeo de partículas de embriones

inmaduros y callo derivado de embriones inmaduros. Una técnica preferida para la transformación del trigo, sin embargo, involucran la transformación del trigo por bombardeo de partículas de embriones inmaduros e incluye una etapa de sucrosa alta o una etapa de maltosa alta antes de suministro al gen. Antes del bombardeo, cualquier número de embriones (0.75-1 mm en longitud) se platean en medio MS con 3% de sucrosa (Murashiga & Skoog, *Physiologia Plantarum* .15: 473-497 (1962)) y 3 mg/l 2,4-D para inducción de embrión somático, que se le permite proceder en la oscuridad. En el día escogido para el bombardeo, se remueven los embriones del medio de inducción y se colocan en el medio osmótico (es decir, medio de inducción con sucrosa o maltosa agregada a la concentración deseada, típicamente 15%). Los embriones se le permiten plasmolizar durante 2-3 horas y luego se bombardean. 20 embriones por placa de tarjeta son típicos, aunque no crítico. Un plásmido que lleva gen apropiado (tal como pCIB3064 o pSG35) se precipita sobre las partículas doradas de tamaño de micrómetro utilizando procedimiento estándar. Cada placa de embrión se dispara con el dispositivo de helio DuPont Biolistics® utilizando una presión de estallido ~1000 psi utilizando un tamiz de malla 80 estándar. Después de bombardeo, los embriones se colocando de regreso en la oscuridad para recuperarse durante aproximadamente 24 horas (todavía en medio osmótico) después de 24 horas, los embriones se remueven del medio osmótico y se colocan de regreso en el medio de inducción en donde ellos permanecen durante aproximadamente 1 mes antes de regeneración. Aproximadamente 1 mes después de que los explantes de embrión con callo embriogénico en desarrollo se transfieren a medio de regeneración (MS + 1 mg/litro NAA, 5 mg/litro GA), que

contiene adicionalmente el agente de selección apropiado (10 mg/1 basta en el caso de pCIB3064 y 2 mg/1 metotrexato en el caso de pSOG35). Después de aproximadamente 1 mes, las espiguillas seleccionadas desarrolladas se transfieren a contenedores estériles mayores conocidos como "GA7" que contienen MS de fuerza media, 2% de sucrosa y la misma concentración de agente de selección.

Transformación de monocotiledóneas utilizando *Agrobacterium* también se ha descrito. Ver, WO 94/00977 y patente U.S. No. 5,591,616, que se incorporan aquí como referencia. Ver también Negrotto et al, Plant Cell Reports 19: 798-803 (2000), incorporado aquí como referencia.

Ejemplo 15: uso de casetes de expresión de la presente invención para conferir tolerancia a las tensiones abióticas en plantas.

Unas ves iniciadas, las espiguillas femeninas del maíz son por definición simas metabólicas. Ellos requieren una corriente de nutriente que consiste de carbohidrato, aminoácidos, cofactores, minerales y otros materiales de tejido en fuente para el desarrollo de combustible. Los tejidos fuente incluyen hojas, raíces, los tallos y otras partes de las plantas vegetativa. Muchas de las cuales llegan en cada espiguilla que se consume rápidamente, se convierte en material de pared celular, proteína, lípidos, ácidos nucleicos etc., muy pocos se mantienen en reserva.

Una corriente de nutrientes cae durante periodos de tensión abiótica. Esta tensión se impone por un número de estímulos que incluyen sequía, cumplimiento de nubes, temperaturas de extremas, y eliminación de nutrientes del suelo. El desarrollo de las espiguillas continúa a pesar de las condiciones de crecimiento, que descansan en reservas de energía y materia prima. Las reservas mantienen el desarrollo durante, al menos, unos pocos días. Si el periodo de tensión abiótica se prolonga las reservas se agotan y cesa el desarrollo de la espiguilla. El resultado es el aborto del grano y producción reducida.

Las casetes de expresión OSMADS de la presente invención se pueden utilizar para incrementar la fuerza de encima en espiguillas femeninas al fusionarlas a los genes que funcionan para incrementar la fuerza de sima. Estos genes incluyen genes de metabolismo de trehalosa, invertasa, y transportador de sucrosa. Muchos de estos genes no se expresan en altamente en espiguillas inmaduras en el desarrollo de espiguilla inmaduras. La expresión específica y temprana en los órganos reproductivos de las plantas, las espiguillas por ejemplo, de cualquiera de estos genes mejorara para mejorara el alimento de la espiguilla sin detrimento de los otros órganos de la planta. La nutrición mejorada permitirá a las espiguillas completar su ciclo de desarrollo y llegar a ser competentes para fertilización durante condiciones de crecimiento ideal y, de forma importante, durante periodos prolongados de tensión abiótica.

El carbón llega en espiguilla en desarrollo como sucrosa. Las espiguillas tienen capacidad limitada para utilizar la sucrosa

debido a que las enzimas que facilitan su entrada al metabolismo no se expresan. Estas enzimas incluyen transportadores de sucrosa que ayudan a la toma de sucrosa cargada del floema. Los casetes de expresión OsmADS pueden incrementar los niveles de transportador de sucrosa en la transmisión y otros tejidos maternos. El desarrollo de combustible de sucrosa importados y el exceso de sucrosa se incorpora en el almidón y las reservas vacuolares. Las reservas de sucrosa y almidón incrementadas permiten a las espiguillas completar el desarrollo durante periodos prolongados de tensión abiótica.

La nutrición por carbono también se puede mejorar por vía de la expresión de invertasa incrementada. Esta familia de enzima cliva la sucrosa en glucosa y fructosa. Ambos monosacáridos se pueden acumular a niveles altos y entrar rápidamente al metabolismo del carbono. Los casetes de expresión OsmADS de la presente invención se pueden utilizar para incrementar los niveles de sucrosa y fructosa en regiones apoplásticas de espiguillas y otros tejidos maternos por vía de la expresión por una pared celular invertasa o apoplástica. Los monosacáridos entran a las células y el metabolismo del carbono más fácilmente que la sucrosa. La utilización de la sucrosa facilitada debe incrementar la carga de sucrosa desde el floema, y la disponibilidad del carbono para desarrollar las espiguillas.

De forma similar, la nutrición por carbono en el citosol de las mazorcas en desarrollo se puede mejorar por vía de la expresión de una invertasa neutra o citosólica. Esta enzima cliva la sucrosa en el citosol, facilitando la entrada en el

metabolismo de carbono. El casete de expresión OsmADS de la presente invención puede incrementar la expresión de invertasa neutra en el desarrollo de las espiguillas. La utilización de sucrosa incrementada en el citosol, en la transmisión de tejido de mazorca relacionado incrementa la demanda de sucrosa y así, la sucrosa y la importa del apoplasto.

La disponibilidad del carbono y la resistencia de tensión abiótica en el desarrollo de espiguillas también se pueden mejorar por vía de expresión de una invertasa de ácido soluble o vacuola. Esta enzima cliva la sucrosa en fructosa y glucosa en la vacuola, haciendo el carbón disponible para metabolismo de energía. La conversión de sucrosa en glucosa y fructosa también incrementa el potencial de soluto de la célula, permitiéndole mantener agua y así, turgencia durante periodos de sequía. Esto permite a las espiguillas continuar desarrollándose a pesar de la disponibilidad de agua reducida. Nuevamente, los casetes de expresión OsmADS de la presente invención pueden incrementar la expresión de invertasa de ácido soluble o vacuola en el desarrollo de espiguillas para los propósitos de mejorar la tolerancia de la tensión abiótica.

Las funciones de trayectoria de trehalosa para regular el particionamiento de carbono entre metabolismo primario y síntesis de almidón. La regulación de esta trayectoria dirige el carbón hacia la síntesis de almidón. Los casetes de expresión OsmADS de la presente invención se pueden utilizar para dirigir la expresión de la sintasa trehalosa-6-fosfato, trehalosa-6-fosfato y fosfatasa y trehalasa en el desarrollo de espiguillas,

incrementando por lo tanto la fuerza de sima y síntesis de almidón en aquellos tejidos. El mantenimiento de un grupo de almidón grande permite el desarrollo de espiguillas para periodos prolongados de tensión abiótica y completar su ciclo de desarrollo.

Aunque la anterior invención se ha descrito en algún detalle por vía de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de entendimiento será obvio que ciertos cambios y modificaciones se pueden practicar dentro del alcance de la presente invención.

REFERENCIAS

Iyer M., Wu L., et al. V (2001) Two step transcriptional amplification as a method for imaging reporter gene expression using weak promoters PNAS 98(25): 14595-14600.

De Bodt, S., Raes, J., Van de Peer, Y., and Theien, G. (2003) And then there were many: MADS goes genomic. Trends Plant Sci. 8(10): 475-483.

Larkin, J.C., Oppenheimer, D.G., Pollock, S., and Marks, M.D. (1993) Arabidopsis GLABROUS1 gene requires downstream sequences for function. Plant Cell. 5(12): 1739- 1748.

Kang, H.-G. and An, G. (1997) Isolation and characterization of a rice MADS box gene belonging to the AGL2 gene family. Mol. Cells. 7(1), 45-51.

Onodera, Y., Suzuki, A., Wu, C-Y., Washida, H., and Takaiwa, F. (2001) A rice functional transcriptional activator, RISBZ1,

responsible for endosperm-specific expression of storage protein genes through GCN4 motif. J. Biol. Chem. 276(17): 14139-14152.

Sieburth, L.E., and Meyerowitz, E.M. (1997) Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. Plant Cell. 9(3): 355-365.

Yu, H., and Goh, C.J. (2000) Identification and characterization of three orchid MADS-box genes of the AP1/AGL9 subfamily during floral transition. Plant Physiol. 123: 1325-1336.

De Bodt et al (2003) And then there were many: MADS goes genomic. Trends Plant Sci. 8(10): 475-483.

Larkin et al (1993) Arabidopsis GLABROUS1 gene requires downstream sequences for function. Plant Cell. 5(12): 1739-1748.

Kang, H.-G. and An, G. (1997) Isolation and characterization of a rice MADS box gene belonging to the AGL2 gene family. Mol. Cells. 7(1), 45-51.

Onodera et al (2001) A rice functional transcriptional activator, RISB21, responsible for endosperm-specific expression of storage protein genes through GCN4 motif. J. Biol. Chem. 276(17): 14139-14152.

Sieburth, L.E., and Meyerowitz, E.M. (1997) Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. Plant Cell. 9(3): 355-365.

Yu, H., and Goh, C.J. (2000) Identification and characterization of three orchid MADS-box genes of the AP1/AGL9 subfamily during floral transition. Plant Physiol. 123: 1325-1336.

Batzer, et al (1991) Enhanced evolutionary PCR using oligonucleotides with inosine at the 3'- terminus. Nucleic Acid Res. 19:5081. Ohtsuka, et al (1985) An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions. J. Biol. Chem. 260:2605- 2608.

Rossolini, et al (1994) Use of deoxyinosine-containing primers vs degenerate primers for polymerase chain reaction based on ambiguous sequence information. Mol. Cell Probes 8:91- 98.

Paszkowski et al (1984). Direct Gene Transfer to Plants. EMBO J 3:2717-2722

Potrykus et al (1985) Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer. Mol. Gen. Genet. 199:169-177

Reich et al (1986) Efficient transformation of alfalfa protoplasts by the intranuclear microinjection of Ti-plasmids. Bio/Technology 4:1001-1004

Klein et al (1987) High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327:70-73.

Uknes et al (1993) Regulation of pathogenesis-related protein- Ia gene expression in tobacco. Plant Cell 5:159-169

Hofgen, R, and Willmitzer, L (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. Nucl. Acid Res. 16:9877

Schocher et al (1986) Co-transformation of foreign genes into plants. Bio/Technology 4:1093-1096

Gordon-Kamm et al (1990) Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants. Plant Cell 2:603-618

Fromm et al (1990) Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. Bio/Technology 8:833-839.

Koziel et al (1993) Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Bio/Technology 11 : 194-200

Zhang et al (1988) Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. Plant Cell Rep. 7:379-384

Shimamoto et al (1989) Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. Nature 338:274-277.

Datta et al (1990) Genetically engineered fertile Indica-rice recovered from protoplasts. Bio/Technology 8:736-740

Datta et al (1990) Genetically engineered fertile Indica-rice recovered from protoplasts. Bio/Technology 8:736-740

Christou et al (1991) Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric-discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. Bio/Technology 9:957-962

Vasil et al (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. Bio/Technology 10:667- 674

Vasil et al (1993) Rapid production of transgenic plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Bio/Technology* 11:1553-1558

Weeks et al (1993) Rapid Production of Multiple Independent Lines of Fertile Transgenic Wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol.* 1102:1077-1084

Murashiga et al (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497

Negrotto et al (2000) The use of phosphomannose isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports* 19:798-803

Eastmond, P.J., van Dijken, A.J.H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A.F., Dickinson, H.G., Jones, J.D.G., Smeekeens, S. C, Graham, L.A. (2002). Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J.* 29, 225-235.

Nuccio, M.L., Russell, B.L., Nolte, K.D., Rathinasabapathi, B., Gage, D.A., Hanson, D.A. (1998). The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant J.* 16, 487-496.

Ranocha, P., McNeil, S.D., Ziemak, M.J., Li, C, Tarczynski, M.C., and Hanson, A.D. (2001). The *is*-methylmethionine cycle in angiosperms: ubiquity, antiquity and activity. *Plant J.* 25, 575-584.

Ritchie, S.W., Hanway, J.J., Benson, G.O. (1997). How a Corn Plant Develops. Special Report No. 48. Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension Service. Ames, Iowa.

Rontein, D., Dieuaide-Noubhani, M., Dufourc, E.J., Raymond, P., Rolin, D. (2002b). The metabolic architecture of plant cells. Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. J. Biol. Chem. 277, 42948-43960.

Vogel, G., Aeschbacher, R.A., Müller, J., Boiler, T. and Wiemken, A. (1998). Trehalose-6- phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. Plant J. 13, 673-683.

Wingler, A. (2002). The function of trehalose biosynthesis in plants. Phytochem. 60, 437- 440.

REIVINDICACIONES

- 1) Un casete de expresión para expresión de producto de molécula de ácido nucleico en el tejido reproductivo de una planta que comprende:
 - a) un promotor, un primer exón; un primer intrón, de un gen MADS, en donde dicho promotor, primer exón, intrón y segundo exón son la secuencia reguladora 5' de dicho casete de expresión; en donde dicha secuencia reguladora 5' se ha construido por ingeniería para incluir un codón de iniciación transnacional en aproximadamente el extremo 3' de dicha secuencia reguladora 5' y no contiene sitios de endonucleasa de restricción que oculten la manipulación por métodos de ADN recombinantes o codones de iniciación de traducción adicional corriente arriba de dicho codón de iniciación transnacional;
 - b) una secuencia reguladora 3' de un gen MADS; y
 - c) una molécula de ácido nucleico ligada operablemente a dicha secuencia reguladora 5' y dicha secuencia reguladora 3'.
- 2) El casete de expresión de la reivindicación 1, en donde el producto de dicha molécula de ácido nucleico cuando se expresa en una planta hace a dicha planta tolerante a la tensión abiótica.
- 3) El casete de expresión de la reivindicación 1, en donde cuando se expresa en una planta el producto de dicha

molécula de ácido nucleico incrementa la fuerza de drenaje en dicho tejido reproductivo de dicha planta.

- 4) El casete de expresión de la reivindicación 2, en donde dicha molécula de ácido nucleico es un gen transportador de sacarosa.
- 5) El casete de expresión de la reivindicación 2, en donde dicha molécula de ácido nucleico es un gen invertasa.
- 6) El casete de expresión de la reivindicación 2, en donde dicha molécula de ácido nucleico es una molécula de interferencia de ARN dirigida contra un gen invertasa.
- 7) El casete de expresión de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ácido nucleico es un gen T6PP.
- 8) El casete de expresión de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ácido nucleico se describe por la SEQ ID NO 531.
- 9) El casete de expresión de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ácido nucleico se describe por la SEQ ID NO 532.
- 10) El casete de expresión de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ácido nucleico se describe por la SEQ ID NO 536, 537, 538, o 539.

- 11) El casete de expresión de la reivindicación 2, en donde dicha molécula de ácido nucleico es un gen de metabolismo de trehalosa.
 - 12) El casete de expresión de la reivindicación 2, en donde dicha molécula de ácido nucleico es una molécula de interferencia de ARN dirigida contra un gen de metabolismo de trehalosa.
 - 13) Un vector recombinante que comprende el casete de expresión de la reivindicación 1.
 - 14) Una célula de planta transgénica que comprende el casete de expresión de la reivindicación 1.
 - 15) Una planta transgénica que comprende la célula de planta transgénica de la reivindicación 10.
 - 16) Una planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha planta es una planta monocotiledonea.
 - 17) Una planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha planta es una planta de maíz.
 - 18) Una planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha planta es una planta de arroz.
 - 19) Semilla de la planta transgénica de la reivindicación 11.
-

20) Semilla de la planta transgénica de la reivindicación 12.

21) Semilla de la planta transgénica de la reivindicación 13.

22) Semilla de la planta transgénica de la reivindicación 14.

23) Plantas que contienen el casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 1.

24) Un casete de expresión que comprende una secuencia reguladora 5' seleccionada de grupo que consiste de la

SEQ	ID	NOS.
6,12,20,28,506,34,39,43,47,51,55,59,63,67,71,75,79,83,87,91,95,99,103,107,111,115,119,123,127,131, y 526 y una		
secuencia reguladora 3' seleccionada del grupo que		
consiste de la	SEQ	ID NOS.
10,16,24,30,507,36,40,44,48,52,56,60,64,68,72,76,80,84,88,92,96,100,104,108,112,116,120,124,128,132,y 527.		

25) Un método para construir un casete de expresión que comprende las etapas de:

a) seleccionar un gen objetivo;

b) identificar la estructura de lectura abierta sobre dicho gen objetivo sADN;

c) identificar las posiciones del codón de inicio transnacional, codón de parada transnacional, el primer

- intrón, primer exón, segundo exón, la secuencia 3' no traducida y la secuencia 3' no transcrita de dicho gADN objetivo al utilizar el cADN para anotar dicho gADN de gen objetivo;
- d) construir una secuencia reguladora 5' que comprende dicho promotor, primer exón, primer intrón, y segundo exón, y una secuencia reguladora 3' que comprende la secuencia 3' no traducida y la secuencia 3' no transcrita; y
- e) Ligar operablemente una molécula de ácido nucleico a dicha secuencia reguladora 5' y dicha secuencia reguladora 3' de dicho casete de expresión, en donde dicha molécula de ácido nucleico se expresa en una forma que imita la expresión de dicho gen objetivo.
- 26) El método de construir un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 25, en donde gen objetivo es un gen MADS.
- 27) El método para construir un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicha molécula de ácido nucleico es un gen transportador de sacarosa.
- 28) Un método para construir un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicha molécula de ácido nucleico es un gen invertasa.

- 29) Un método para construir un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicha molécula de ácido nucleico es un gen de metabolismo de trehalosa.
- 30) Un método para construir un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 25, en donde dicho gen de metabolismo de trehalosa es un gen sintasa trehalosa-6-fosfato, un gen trehalosa-6-fosfato fosfatasa o un gen trehalasa.
- 31) Un método para construir un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 24, en donde dicho gen invertasa es un gen invertasa de ácido soluble, en un gen invertasa neutral soluble o un gen invertasa de ácido insoluble.
- 32) Un método para construir un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende adicionalmente la etapa de construir por ingeniería un codón de iniciación transnacional en aproximadamente extremo 3' de dicha secuencia reguladora 5'.
- 33) El método para construir un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende adicionalmente la etapa de construir por ingeniería dicho casete de expresión que no contiene sitios de restricción de endonucleasa que oculta la manipulación por los métodos de ADN recombinante o codones de iniciación de

traducción adicional corriente arriba de dicho codón de iniciación de traducción.

34) Un método para conferir tolerancia a la tensión abiótica a una planta que comprende las etapas de construir un casete de expresión que comprende secuencias reguladoras 5' y secuencias reguladoras 3' de la familia del gen MAD.

35) Un método para construir un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicha secuencia reguladora 5' se selecciona del grupo que consiste de las SEQ ID NOS. 6, 12, 24, 30, 507, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, y 527.

36) Un método para construir un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicha secuencia reguladora 3' se selecciona del grupo que consiste de las SEQ ID NOS. 10, 16, 24, 30, 507, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, y 527.

37) Un método para construir un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicho gen objetivo se selecciona basado en sus datos de expresión.

WFO 2006/10/03/4

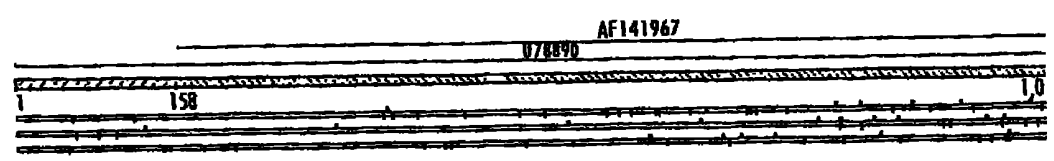
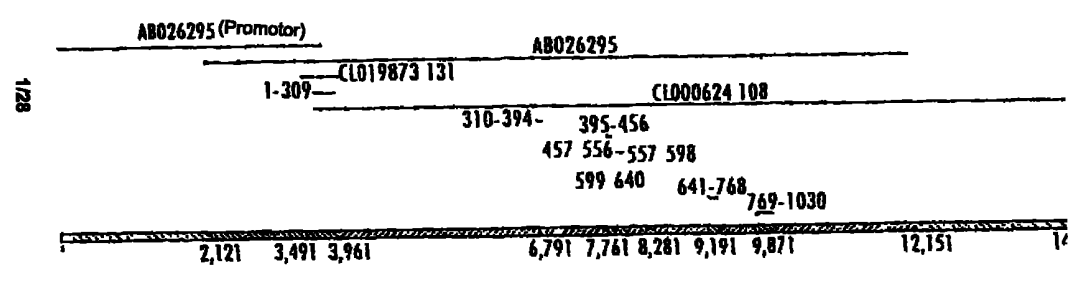


FIG 1A



PCT/US2006/013245

152

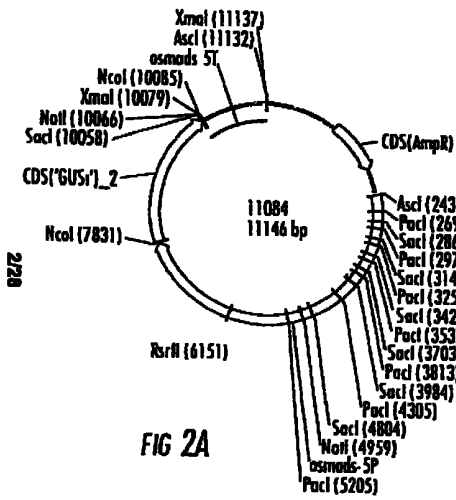


FIG 2A

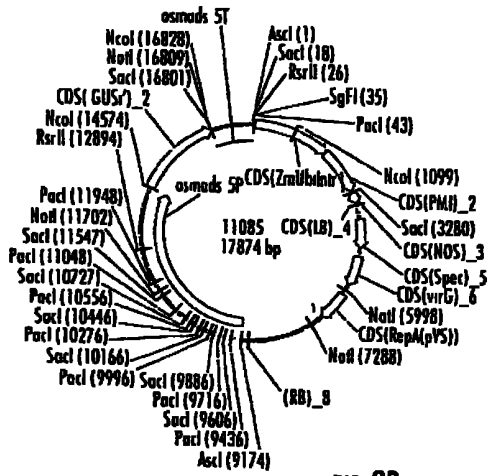


FIG 2B



FIG. 3A



FIG. 3B



FIG. 3C



FIG. 3D



FIG. 3E

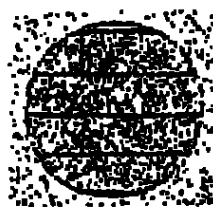


FIG. 3F



FIG. 3G

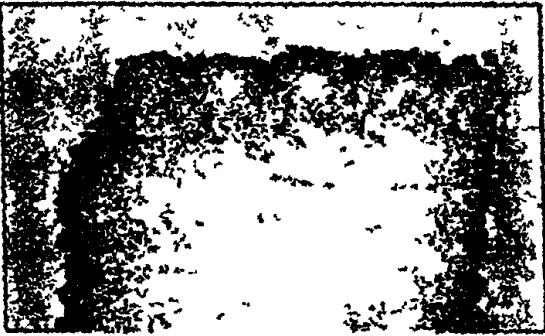


FIG 4A



FIG 4B

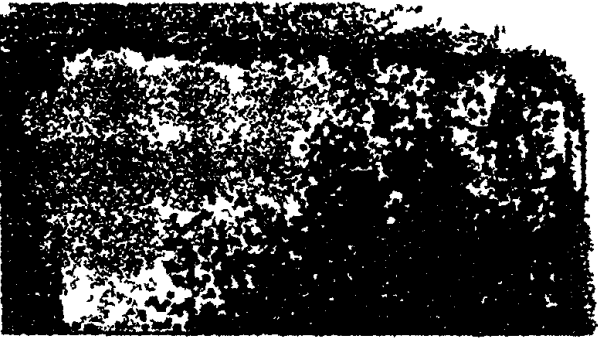


FIG 4C

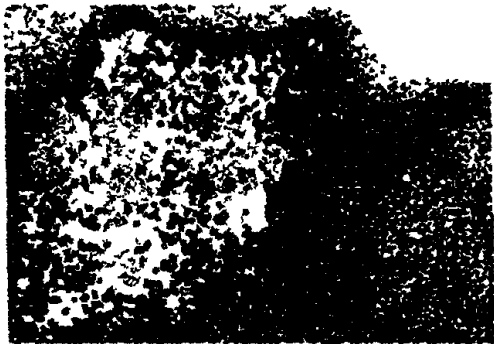


FIG 4D

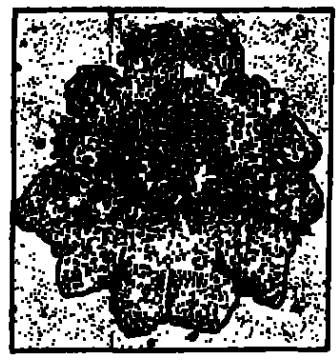


FIG. 5A



FIG. 5B

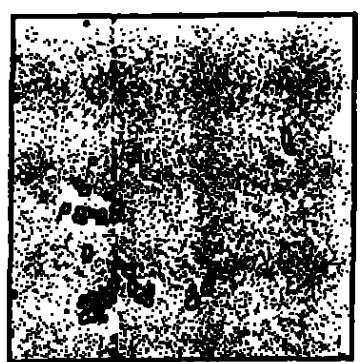


FIG. 5C



FIG. 5D



FIG. 5E



FIG. 5F

WFO 2005/10/24

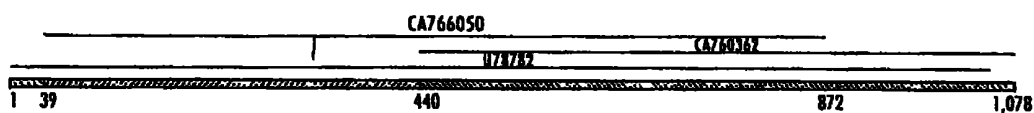


FIG 6A

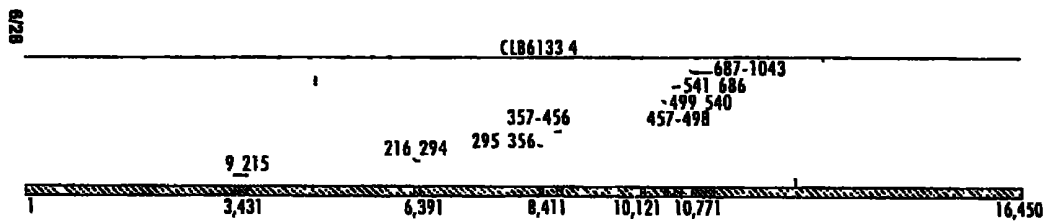


FIG 6B

PC7152106/11/24

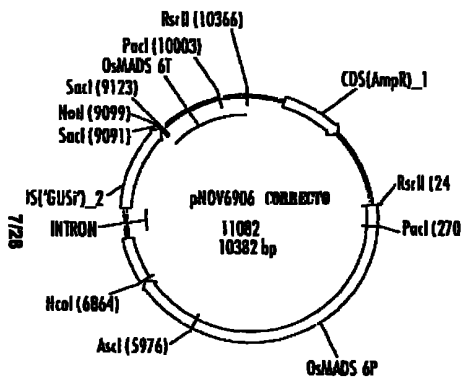


FIG 7A

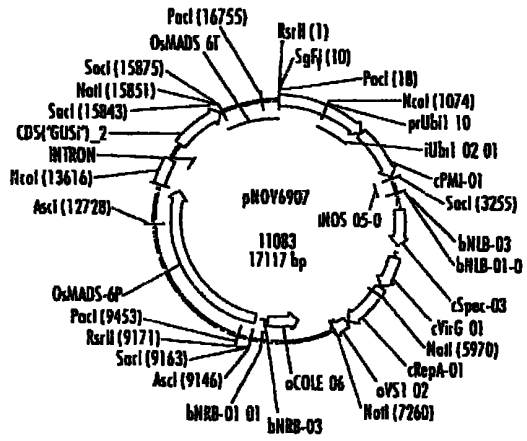


FIG 7B

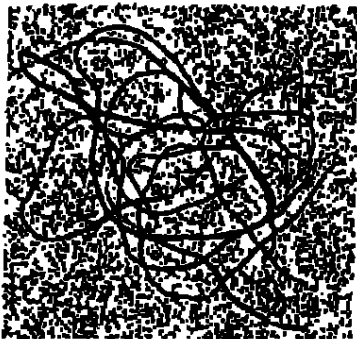


FIG. 8A



FIG. 8B



FIG. 8C

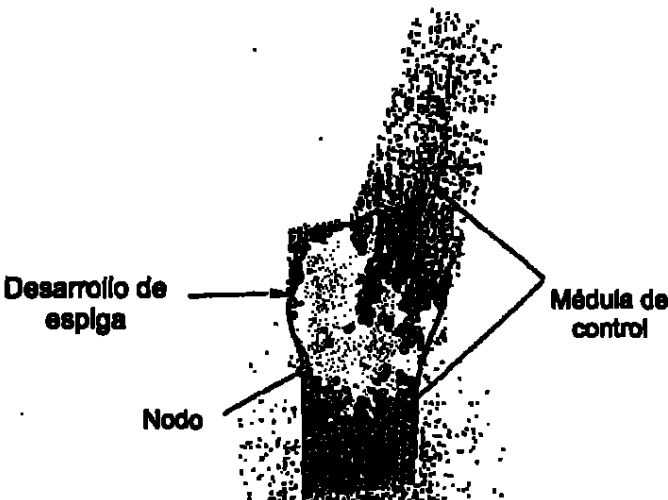


FIG. 8D



FIG. 8E

W/O 2MS/122134

PCT/US2005/013345

160



FIG 9A



FIG 9B

VASCULATURA EXTERNA

VASCULATURA EXTERNA

8/28



FIG 9C

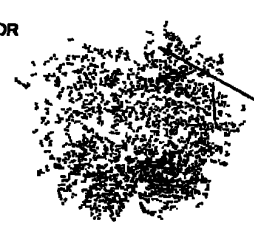


FIG 9D

TEJIDO TRANSMISOR

TEJIDO TRANSMISOR

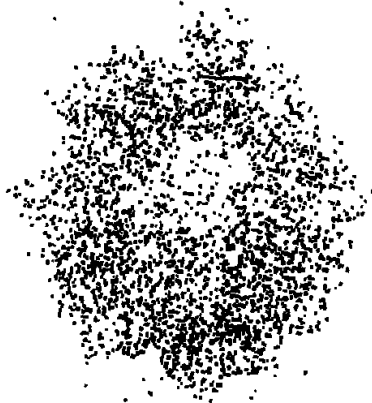


FIG. 10A

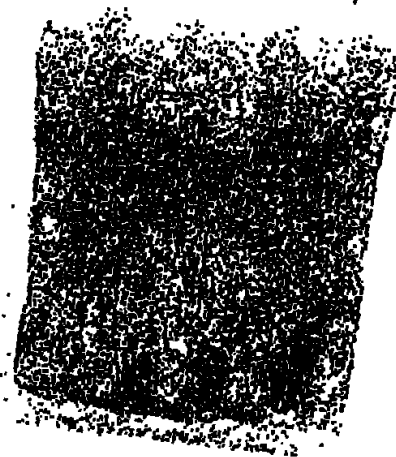


FIG. 10B



FIG. 10C



FIG. 10D

WO 2004/0204

PCT/US2003/013245

108



FIG 11A



FIG 11B



FIG 11C

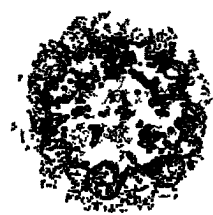


FIG 11D

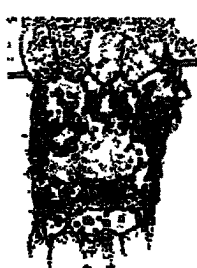


FIG 11E



FIG 11F



FIG 11G

11/28

163

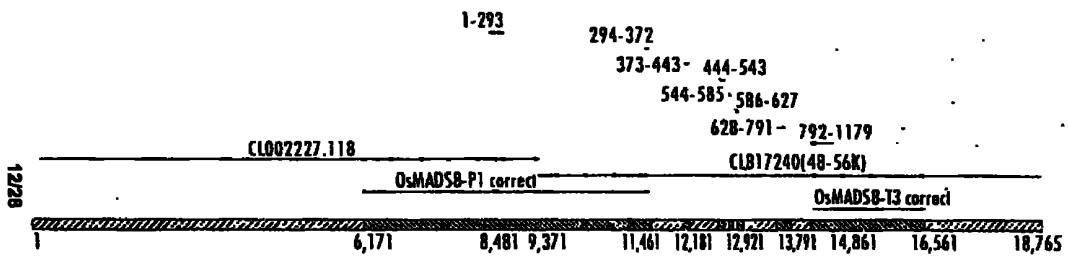


FIG. 12

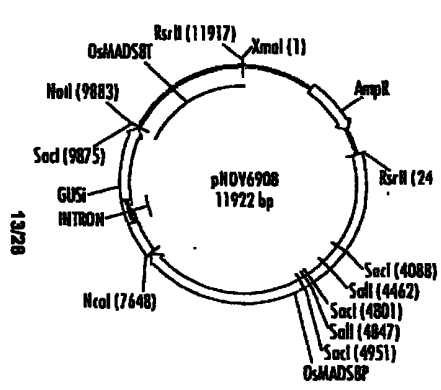


FIG. 13A

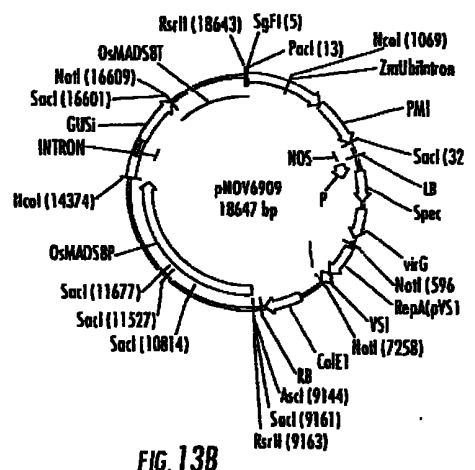


FIG. 13B

154



FIG 14A

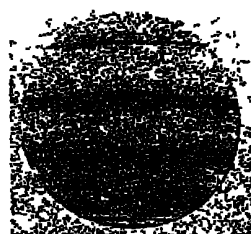


FIG 14B



FIG 14C



FIG 14D



FIG 14E

Florescilles

Florescilles



FIG 14F



FIG 14G

14/28

16



FIG 15A



FIG 15B

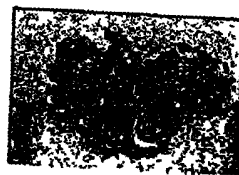


FIG 15C



FIG 15D

15/28



FIG 15E



FIG 15G

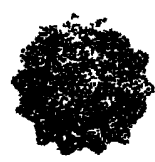


FIG 15H



FIG 15I



FIG 15F



FIG 16A



FIG 16C

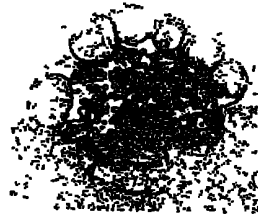


FIG 16E

16/28



FIG 16B



FIG 16D



FIG 16F

WFO 2005/10/20/04

PC70520505012245

1588

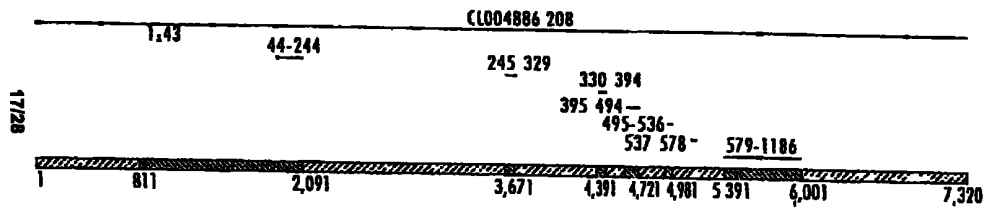


FIG 17

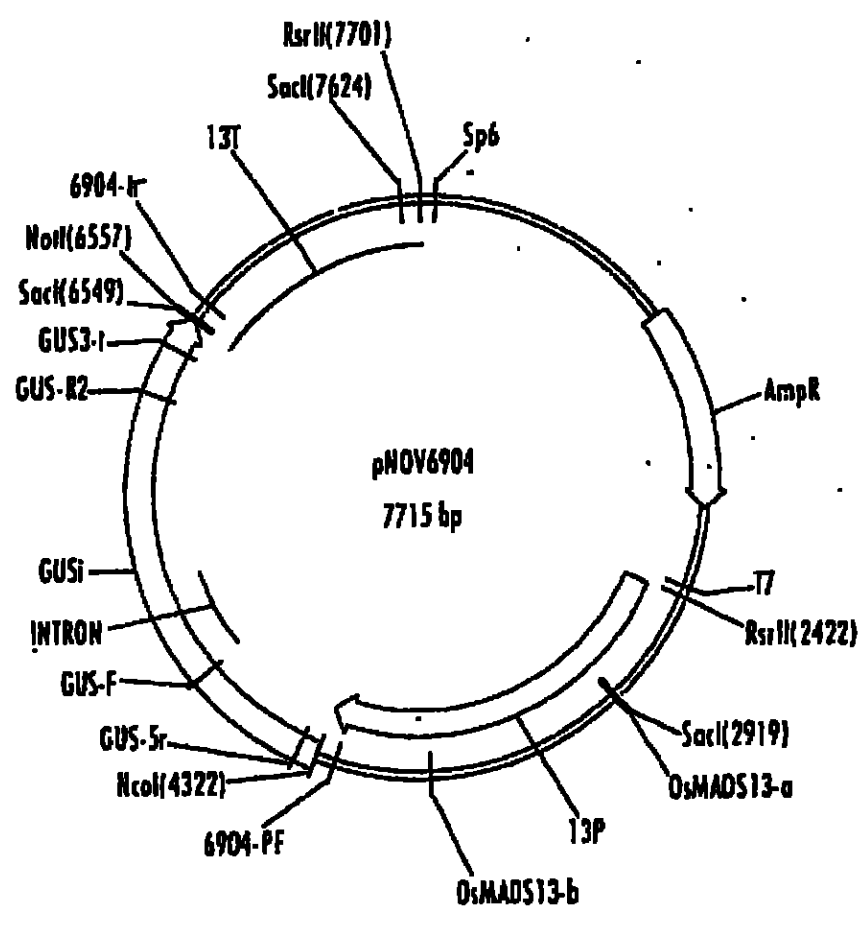


FIG. 18

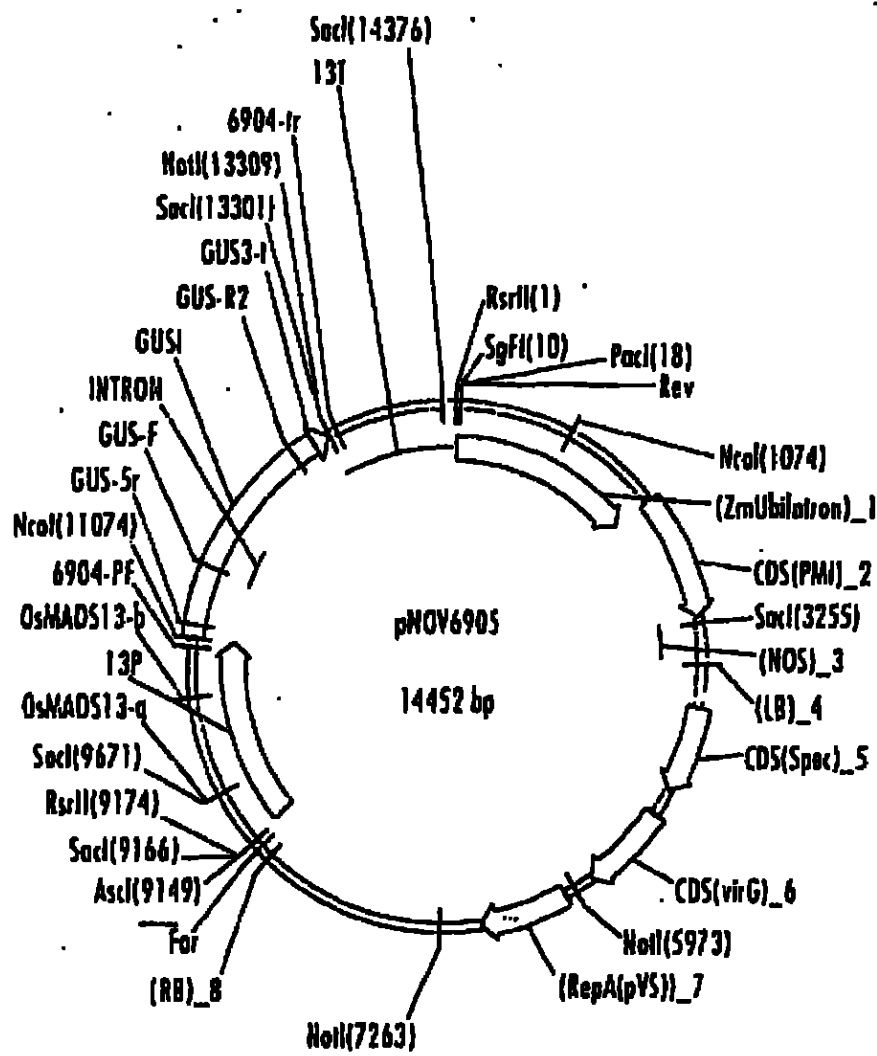


FIG. 19



FIG 20A



FIG 20B



FIG 20C



20/28

FIG 20D

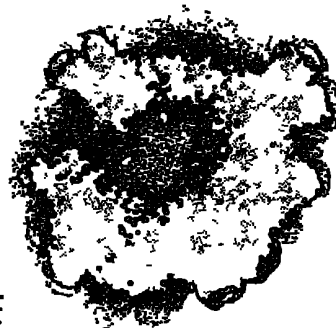


FIG 20E

127

WFO 2005/10254

PCT/US2005/012545

172



FIG 21A



FIG 21B

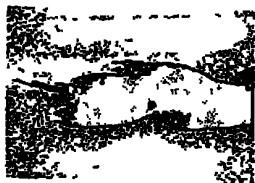


FIG 21C



FIG 21D

21/28



FIG 22A

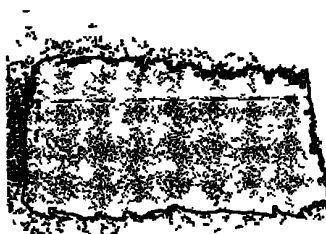


FIG 22B

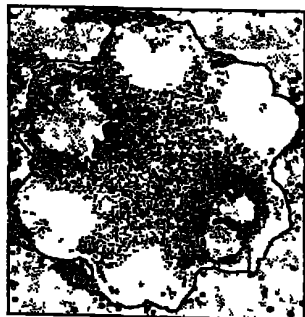


FIG 22C



FIG 22D

22/28

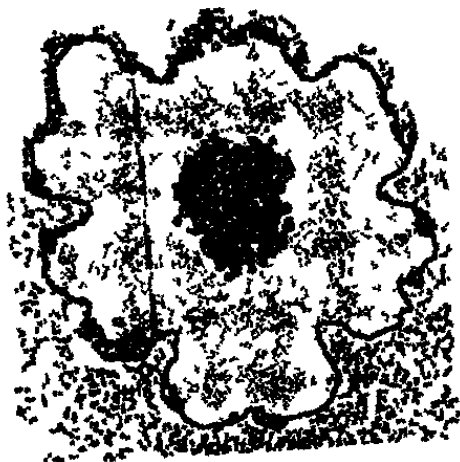


FIG 23A

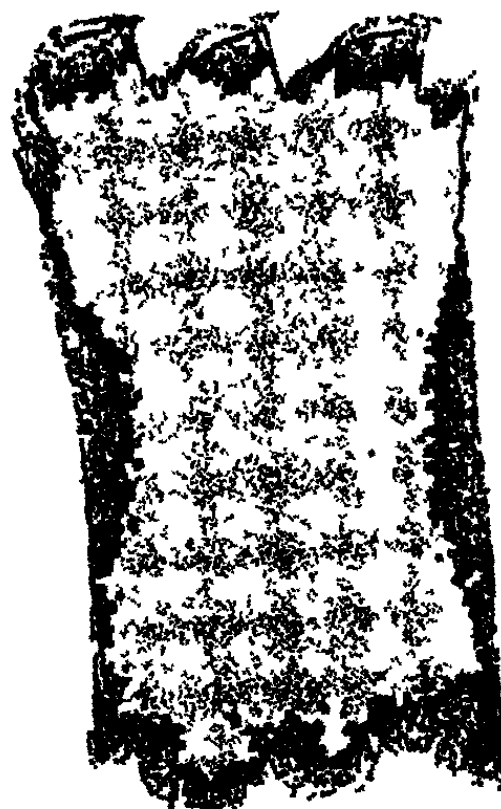


FIG 23C

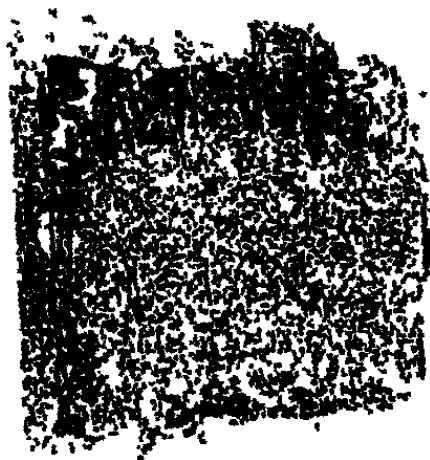


FIG 23B

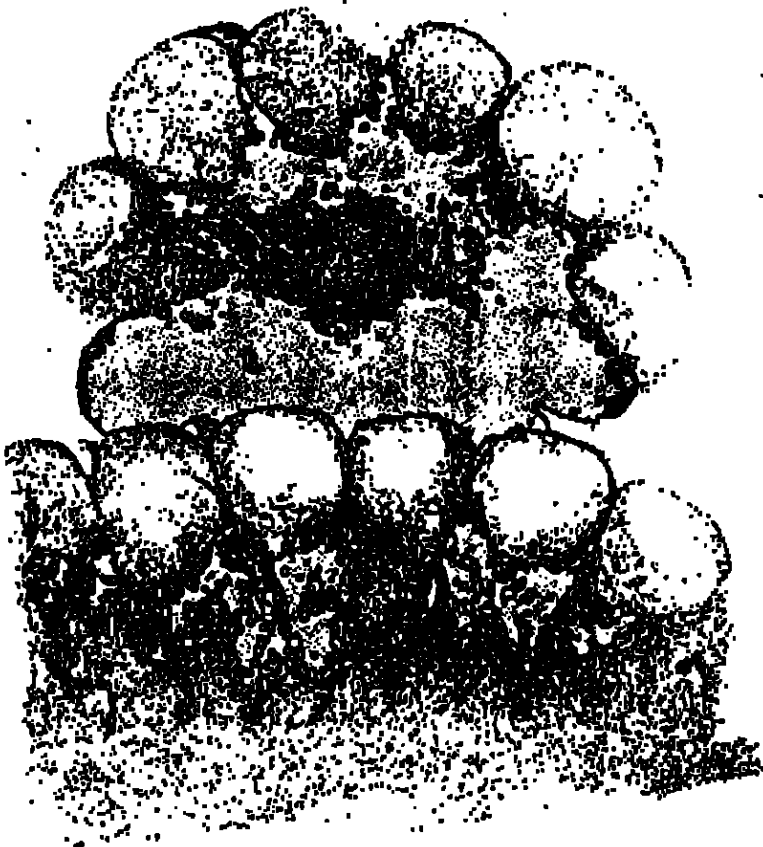


FIG. 24



FIG. 25A



FIG. 25B

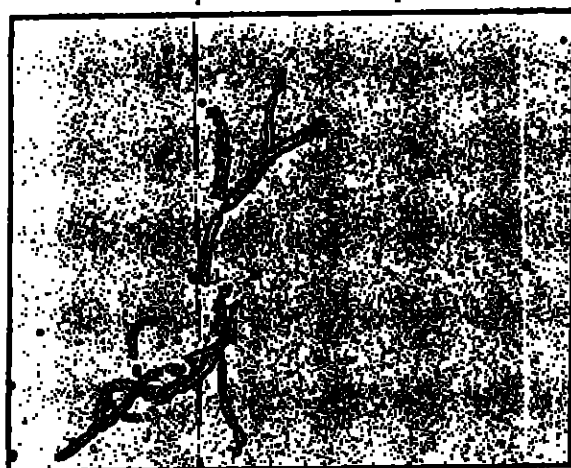


FIG. 25C



FIG. 25D

WO 2005/02034

PT/US2005015345

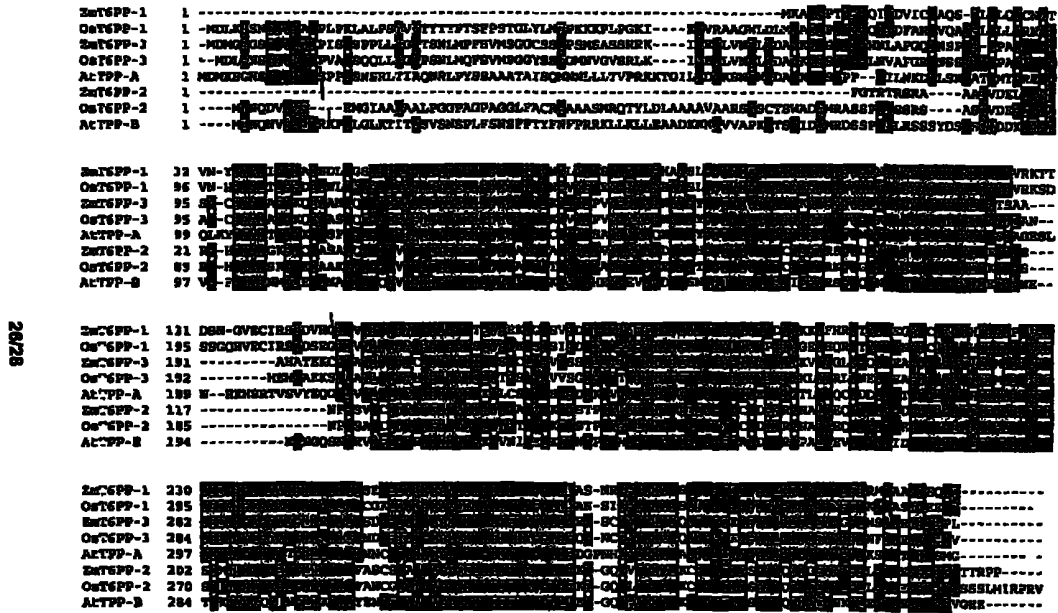


FIG 26

179

20/28

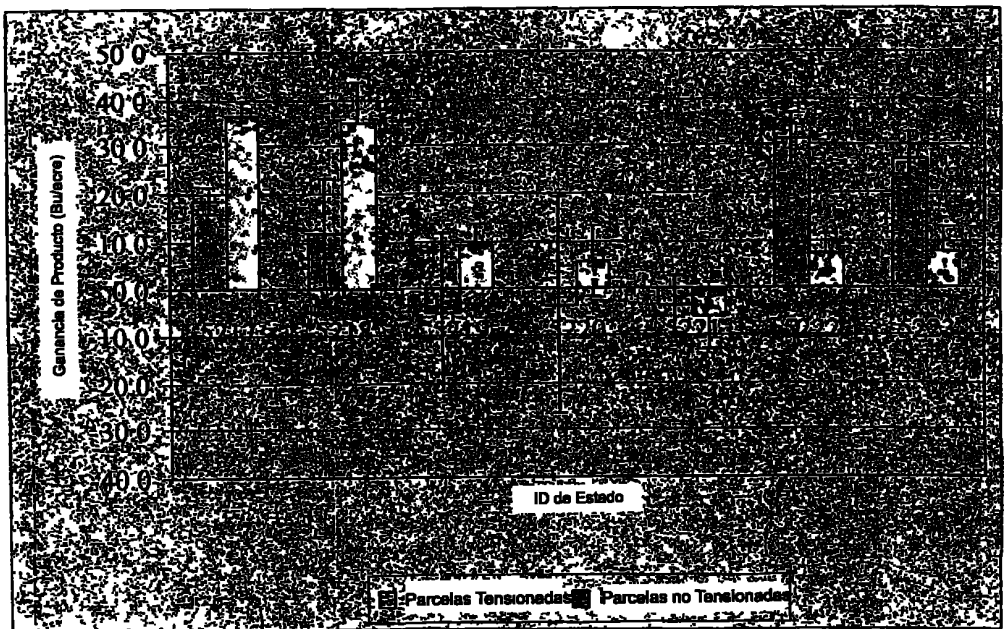


FIG 28

Iniciadores para secuencia reguladora 3' de clon	
Nombre	Secuencia
AB003322-3 (SEQ. ID No. 135)	5'-TAACTGAAAGGAAAAAAGCATCTTGC-3'
AB003322-4 (SEQ. ID No. 136)	5'-GAATAAATCTGGCAACTGAAATCCAACCAT-3'
AB003324-3 (SEQ. ID No. 147)	5'-CTAGCTAGCTAGCTACCGTTTCAGCTTC-3'
AB003324-4 (SEQ. ID No. 148)	5'-TGGAGATCGACCACAATTAAATTCGT-3'
AB003328-3 (SEQ. ID No. 160)	5'-TAACTAACAGGCCAGGAATAAGCTGG-3'
AB003328-4 (SEQ. ID No. 161)	5'-ATTGCCGCGCTATAGCCTTTCTCCCT-3'
AB077760-1 (SEQ. ID No. 169)	5'-TGATATATCATCGCCGCCGCCGCCG-3'
AB077760-4 (SEQ. ID No. 170)	5'-CCGTGGTACTGAAAACGAAAAAAGAAATG-3'
AB095645-3 (SEQ. ID No. 181)	5'-TAACTGCTAGGTTGCCCGGCCACT-3'
AB095645-4 (SEQ. ID No. 182)	5'-GCACCGCTACCTCTCGCCGGAGTACG-3'
AF139664-3 (SEQ. ID No. 195)	5'-TAAAGAGGCTTCAGATCCATACCAG-3'
AF139664-4 (SEQ. ID No. 196)	5'-GGATAAACATTGTGAAGCAACATTTG-3'
AF139665-3 (SEQ. ID No. 209)	5'-TGAAGGCATCTGTTGATCTCAAACCTC-3'
AF139665-4 (SEQ. ID No. 210)	5'-ATGAAGTCCACCTCGGGAAGTCAACCT-3'
AF141964-3 (SEQ. ID No. 220)	5'-TGAGCAAGAAAGCACAGGTGTCTCT-3'
AF141964-4 (SEQ. ID No. 221)	5'-ATGAGATACAATCTAGTACAACGAAT-3'
AF141965-3 (SEQ. ID No. 234)	5'-TGAAGAAGGCCAGCCACACCAACAGCTG-3'
AF141965-4 (SEQ. ID No. 235)	5'-CCTTATCGAATATTCAAATCTCGATG-3'
AF174093-3 (SEQ. ID No. 248)	5'-TGACTTCCCTGGAAGCAGTAGGAAC-3'
AF174093-4 (SEQ. ID No. 249)	5'-CCCCTTCTCTCTCTCCGGGAAGAAAG-3'
AF204063-3 (SEQ. ID No. 260)	5'-TGA'TGTGTGTGTTCAATTTCAGGCTT-3'
AF204063-4 (SEQ. ID No. 261)	5'-CTGCATATACTTGCAACATTGCAATTTTA-3'
AF345911-3 (SEQ. ID No. 273)	5'-TAAGATGATCATCGTCCCTCGTCTCG-3'
AF345911-4 (SEQ. ID No. 274)	5'-TGGACTTAAATGGCAAGATAAATTAGATATA-3'
AF424549-3 (SEQ. ID No. 285)	5'-TGAGATATCATCGCCCGCCGCCGCCG-3'
AF424549-4 (SEQ. ID No. 286)	5'-TTTTATTATCTTGGCAAGGCCCAAGCACCTTTG-3'
AJ293816-3 (SEQ. ID No. 297)	5'-TGATCGCTGGAAACTAAACTGAGAGGA-3'
AJ293816-4 (SEQ. ID No. 298)	5'-TTTGAAACATTTCCGGCCCTGGCTCTCT-3'
AY115556-3 (SEQ. ID No. 307)	5'-TAACACTAATAATGGCCTGGGGGATAC-3'
AY115556-4 (SEQ. ID No. 308)	5'-AACTTTGCACGAATGATTAAATTCAT-3'
AY177695-3 (SEQ. ID No. 318)	5'-TAACACATGATCAAOTOTTAATAACAG-3'
AY177695-4 (SEQ. ID No. 319)	5'-GGCTCGTCAAACCAGCTTGGTGAGCT-3'

Iniciadores para secuencia reguladora 3' de clon	
Nombre	Secuencia
AB003322-3 (SEQ. ID No. 135)	5'-TAACTGAAAGGAAAAAAGCATCCTTGC-3'
AB003322-4 (SEQ. ID No. 136)	5'-QAATAAATCTGGCAACTGAAATCCAACCAT-3'
AB003324-3 (SEQ. ID No. 147)	5'-CTAGCTAGCTAGCTACCGTTTCAGCTTC-3'
AB003324-4 (SEQ. ID No. 148)	5'-TGGAGATCGACCACAATTAATTCGT-3'
AB003328-3 (SEQ. ID No. 160)	5'-TAACTAAGAGGCCAGGAATAAGCTGG-3'
AB003328-4 (SEQ. ID No. 161)	5'-ATTGCCCGGCTATAGCCTTTCTCCT-3'
AD077760-3 (SEQ. ID No. 169)	5'-TGATATATCATCGCCCGCCGCCG-3'
AD077760-4 (SEQ. ID No. 170)	5'-CCGTGGTACTGAAATCGAAAAAGAAATG-3'
AB095645-3 (SEQ. ID No. 181)	5'-TAACTGCTAGGTTCCCGCCGCACT-3'
AB095645-4 (SEQ. ID No. 182)	5'-GCACGGCTACCTCTCGCCGGAATACG-3'
AF139664-3 (SEQ. ID No. 193)	5'-TAAAGAGGCTTCAGATCCATACCAG-3'
AF139664-4 (SEQ. ID No. 196)	5'-GQATAAACATTGTGAAGCAACATTTC-3'
AF139665-3 (SEQ. ID No. 209)	5'-TGAAGGCATCTGTGATCTCAAACTC-3'
AF139665-4 (SEQ. ID No. 210)	5'-ATGAAGTCCACCTCGGGAAGTCAAGCT-3'
AF141964-3 (SEQ. ID No. 220)	5'-TGAGCAAGGAAGCACAGGTGTCTGT-3'
AF141964-4 (SEQ. ID No. 221)	5'-ATGAGATACAATCTAGTACAACGAAT-3'
AF141965-3 (SEQ. ID No. 234)	5'-TGAAGAAAGCCAGCCACAACAAGCTG-3'
AF141965-4 (SEQ. ID No. 235)	5'-CCTTATCGAATATTCAAATCTCGATG-3'
AF174093-3 (SEQ. ID No. 248)	5'-TGAAGTCTGGAAGCAATAGGAAC-3'
AF174093-4 (SEQ. ID No. 249)	5'-CCCCTCTCCTCCTCCGGGAAGAAAG-3'
AF204063-3 (SEQ. ID No. 260)	5'-TGATGTGTGTGTTCAATTCAAGCTT-3'
AF204063-4 (SEQ. ID No. 261)	5'-CTGCATATACTTCAACAATTGCAATTGA-3'
AF345911-3 (SEQ. ID No. 273)	5'-TAAGATGATCATCGTCCGTCGTGTCG-3'
AF345911-4 (SEQ. ID No. 274)	5'-TTTGAAGTAAATGGCAAGATAAATTAGATATAG-3'
AF424549-3 (SEQ. ID No. 285)	5'-TGAGATATCATCCCGCCCGCCCGCCG-3'
AF424549-4 (SEQ. ID No. 286)	5'-TTTTATTATCTTGGCAGAGUCCCAAGCACCTTG-3'
AJ293816-3 (SEQ. ID No. 297)	5'-TGATGGCTGGAAACTAAACTGAGAGGA-3'
AJ293816-4 (SEQ. ID No. 298)	5'-TTTGAAACATTTCGGCCCTGCTCTCCT-3'
AY115556-3 (SEQ. ID No. 307)	5'-TAACTAATAATGGCTGGGGGATAC-3'
AY115556-4 (SEQ. ID No. 308)	5'-AACTTTGCAAGAAATGATTAAATTGCAT-3'
AY177695-3 (SEQ. ID No. 318)	5'-TAACACATGATCAAGTGTAAAAACAG-3'
AY177695-4 (SEQ. ID No. 319)	5'-GGCTCGGTCAAACCAGCCTGCTGAGCT-3'

AY177696-3 (SEQ. ID No. 332)	5'-TGACCAGAAAAACATTGTTTTCCTAC-3'
AY177696-4 (SEQ. ID No. 333)	5'-TTTGGGATTGGACTGCATCCAGGAA-3'
AY177698-3 (SEQ. ID No. 344)	5'-TGATTGCCCTCTTTCCATCCCAATAAG-3'
AY177698-4 (SEQ. ID No. 345)	5'-GTTAAGCTAAAAAATAATTGTTTACG-3'
AY177699-3 (SEQ. ID No. 358)	5'-TAGAAACAGATGACCGCTGACGTTCA-3'
AY177699-4 (SEQ. ID No. 359)	5'-AGGCTTGGTGAAGGATACGAAATCTT-3'
AY177700-3 (SEQ. ID No. 368)	5'-TAACCGTCAAGAACCTTGGTCAATTTC-3'
AY177700-4 (SEQ. ID No. 369)	5'-TAATTTTACTAGTACTTTTACTTTGAC-3'
AY177702-3 (SEQ. ID No. 381)	5'-TAAUACIATGGCCTACAAAGCTGACGA-3'
AY177702-4 (SEQ. ID No. 382)	5'-CCGTGGTTGTCACAGAAACCAATCTATAC-3'
AY224482-3 (SEQ. ID No. 394)	5'-TAAGACTATGCCGTACAAAGCTGACGA-3'
AY224482-4 (SEQ. ID No. 395)	5'-CCGTGGTTGTCACAGAAACCAATCTATAC-3'
AY250075-3 (SEQ. ID No. 407)	5'-TAGAAGATGTTTCAGATGAAATGGTCCCT-3'
AY250075-4 (SEQ. ID No. 408)	5'-AAAAAATCACCGCGGTCAAAATATTAGGGA-3'
L37527-3 (SEQ. ID No. 421)	5'-TAGTCTGCTGAGCACTGCCAATTTC-3'
L37527-4 (SEQ. ID No. 422)	5'-TGCTGGTCTCGAAGTCTGAGCGCG-3'
L37528-3 (SEQ. ID No. 434)	5'-TAGTCTTGGTGTAGACACGCTACGTAC-3'
L37528-4 (SEQ. ID No. 435)	5'-TGAAAGCTACATTTTACGCTGTATTTC-3'
U78891-3 (SEQ. ID No. 445)	5'-TGAACAGTGGTGCATGAACACCTACATG-3'
U78891-4 (SEQ. ID No. 446)	5'-GATGTTTTTTTGTCTTTGATGCAAGGCC-3'
AF095646-3 (SEQ. ID No. 510)	5'-TGAAGTCCAAGCTTGTAAATAAAAAGGCTG-3'
AF095646-4 (SEQ. ID No. 511)	5'-AAGGTTAGGCTGCACGAAATGC-3'

Iniciadores para mutagénesis de secuencia reguladora 5'	
Nombre	Secuencia
AB003322-5 (SEQ. ID No. 137)	5'-CGCGCUGCGGCGATGCGCGGAGAGCGG-3'
AB003322-6 (SEQ. ID No. 138)	5'-CTCTGTTCGACAGTATCAATGAAATC-3'
AB003322-7 (SEQ. ID No. 139)	5'-ATTTCATCCATGCTACAATTTATTT-3'
AB003322-8 (SEQ. ID No. 140)	5'-AGAAGGCCGAGGAGGTCTCCGTGCTC-3'
AB003324-5 (SEQ. ID No. 149)	5'-TCGAUCCGGAGATCGAATCGGCGGAGCA-3'
AB003324-6 (SEQ. ID No. 150)	5'-AATTCATATTCAAGATCCTTAAAGAC-3'
AB003324-7 (SEQ. ID No. 151)	5'-ACTGTCCAGATGAGGTGATCGGCTCAT-3'
AB003324-8 (SEQ. ID No. 152)	5'-AGGCCTACGAGCTGTCCATCTCTGCGA-3'
AB003324-9 (SEQ. ID No. 153)	5'-ACGCGTCCGCGCATGCGTCTCTTACTAG-3'
AB077760-5 (SEQ. ID No. 171)	5'-GCTGCAGGGGCGCGGCATCGGAGGGGCAATCGA-3'
AB077760-6 (SEQ. ID No. 172)	5'-CCACCGGGATGATCAAGAAAGCCAG-3'
AB077760-7 (SEQ. ID No. 173)	5'-TCCCATCATCATCTTCTCCTCCAG-3'
AB077760-8 (SEQ. ID No. 174)	5'-ATGAAGAAAGCCAGGCTGCTCACCGTGTCT-3'

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 70369WOPCT

Box No. I TITLE OF INVENTION
REGULATORY SEQUENCES FOR EXPRESSING GENE PRODUCTS IN PLANT REPRODUCTIVE TISSUE

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

SYNGENTA PARTICIPATIONS AG
Schwarzwaldallee 215
4058 Basel Switzerland

Telephone No.
41 61 323 1111

Facsimile No.
41 61 323 5044

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

CH

State (that is, country) of residence:

CH

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☒ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

NUCCIO, Michael L.
3054 Cornwallis Road
Research Triangle Park, North Carolina 27709
United States of America

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☐ agent

☒ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

SYNGENTA PARTICIPATIONS AG
3054 Cornwallis Road
Research Triangle Park, North Carolina 27709
United States of America

Telephone No.
919 541 8614

Facsimile No.
919 541 8689

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

184

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) LAGRIMINI, L. Mark 3054 Cornwallis Road Research Triangle Park, North Carolina 27709 United States of America	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) MEGHJI, Moez 14658 E. 925 Road Bloomington, IL 61704	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.	

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

- ☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection
- ☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection
- ☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other States.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 20/04/2004	60/563,687	US		
item (2) 20/04/2004	60/563,678	US		
item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:

☒ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organisation for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)).

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / US

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

Number of declarations

- ☐ Box No. VIII (i) Declaration as to the identity of the inventor :
- ☐ Box No. VIII (ii) Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent :
- ☐ Box No. VIII (iii) Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application :
- ☐ Box No. VIII (iv) Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) :
- ☐ Box No. VIII (v) Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty :

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains: (a) on paper, the following number of sheets: request (including declaration sheets) : 4 description (excluding sequence listing and/or tables related thereto) : 77 claims : 3 abstract : 1 drawings : 28 Sub-total number of sheets : 113 sequence listing : tables related thereto : (for both, actual number of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below) Total number of sheets : 113 (b) ☐ only in electronic form (Section 801(a)(i)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto (c) ☐ also in electronic form (Section 801(a)(ii)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the ☒ sequence listing: 4 CD-ROM's ... ☐ tables related thereto: ... (additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)		This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item): 1. ☒ fee calculation sheet : 1 2. ☐ original separate power of attorney : 3. ☐ original general power of attorney : 4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: : 5. ☐ statement explaining lack of signature : 6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): : 7. ☐ translation of international application into (language): : 8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material : 9. ☒ sequence listing in electronic form (indicate type and number of carriers) : (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) : (ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter : (iii) ☒ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column : 1 10. ☐ tables in electronic form related to sequence listing (indicate type and number of carriers) : (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application) : (ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater) : (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column : 11. ☐ other (specify): Payment Form, Express Mail, Postcard : 3	
Figure of the drawings which should accompany the abstract: 1		Language of filing of the international application: English	

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).



VRANA, Bruce, Reg. No. 38,672
for SYNGENTA PARTICIPATIONS AG

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 1(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



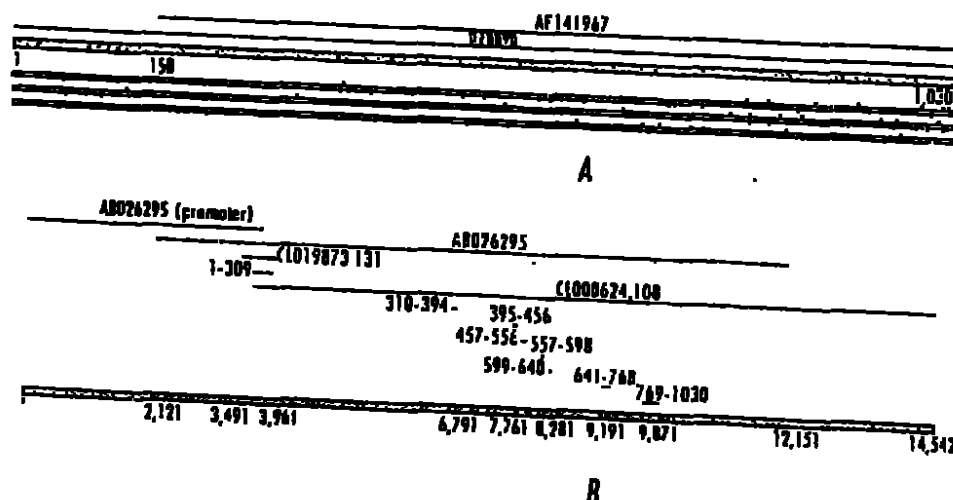
(43) International Publication Date
3 November 2005 (03.11.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/102034 A2

- (51) International Patent Classification⁷: A01H 1/00
- (21) International Application Number:
PCT/US2005/013245
- (22) International Filing Date: 19 April 2005 (19.04.2005)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/563,687 20 April 2004 (20.04.2004) US
60/563,678 20 April 2004 (20.04.2004) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SYNGENTA PARTICIPATIONS AG [CH/CH]; Schwarzwaldallee 215, CH-4058 Basel (CH).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventor/Applicants (for US only): NUCCIO, Michael, L. [US/US]; 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, NC 27709 (US). LAGRIMINI, Mark, L. [US/US]; 4008, New Yarmouth Way, Apex, NC 27502 (US). MEGHJI, Moez [US/US]; 14658 East 925 North Road, Bloomington, IL 61704 (US).
- (74) Common Representative: SYNGENTA PARTICIPATIONS AG; 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, NC 27709 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: REGULATORY SEQUENCES FOR EXPRESSING GENE PRODUCTS IN PLANT REPRODUCTIVE TISSUE



(57) Abstract: Expression cassettes causing specific regulatory control of transgene expression in plants, wherein the expression cassettes include regulatory sequences from the MARS gene family for expression of recombinant gene products in the reproductive tissue of plants for the purpose of generating abiotic stress tolerant plants.

WO 2005/102034 A2

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN APPLICATION OF:

Syngenta Participations AG et al.

INTERNATIONAL APPLICATION NO:

PCT/US05/13245

INTERNATIONAL FILING DATE:

19 April 2005

**TITLE: REGULATORY SEQUENCES FOR
EXPRESSING GENE PRODUCTS IN
PLANT REPRODUCTIVE TISSUE**

Mail Stop PCT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

**CORRECTION OF APPLICANT(S) AND/OR INVENTOR(S) ADDRESSES
AS STATED IN THE REQUEST**

Dear Sir or Madam:

This paper is being filed in order to correct the address listing for applicants and inventors LAGRIMINI, L. Mark and MEGHJI, MOEZ in the above-identified international application.

Accordingly, Applicant submits herewith a substitute Sheet No. 2 of the PCT Request (Form PCT/RO/101 continuation sheet) in order to correct the address listing for applicants and inventors LAGRIMINI, L. Mark and MEGHJI, Moez.

Applicant respectfully requests that the International Bureau publish the addresses contained in the enclosed Sheet No. 2 of the PCT Request (Form PCT/RO/101 continuation sheet) and not the addresses stated in the original Sheet No. 2 of the PCT Request (Form PCT/RO/101 continuation sheet).

Syngenta Participations AG et al.
International application No. PCT/US05/13245

It is believed that no fee is due with this submission. However, the Commissioner is hereby authorized to charge any fee under 37 C.F.R. §1.17, which may be required to maintain the pendency of the above application to Deposit Account No. 50-1744 in the name of Syngenta Biotechnology, Inc.

Syngenta Biotechnology, Inc.
3054 Cornwallis Road
Research Triangle Park, NC 27709

Respectfully submitted,



Bruce Vrana
Reg No. 38,672
Phone: (919) 541-8614

Date:

5/16/2005

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

LAGRIMINI, L. Mark
4008 New Yarmouth Way
Apex, North Carolina 27502
United States of America

This person is:

- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
USState (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MEGHJI, Moez
14658 E. 925 Road
Bloomington, IL 61704
United States of America

This person is:

- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:
USState (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

[]

MODELO DE UTILIDAD

[]

- ♦ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ♦ Descripción de la invención []
- ♦ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ♦ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ♦ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ♦ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ♦ Representación gráfica del esquema trazado []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha: 09 OCT 2006

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

192

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
ESCOBAR URIBE JIMENA
Apoderado(a) y/o Representante de
SYNGENTA PARTICIPATIONS AG

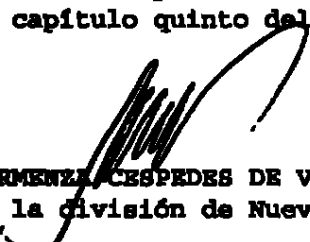
REFERENCIA	Radicación No.	6 101616
	Solicitud internacional	PCT/US2005/013245
	Fecha inicio fase nacional	20/11/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	1390?

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPÉDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 01 Dic. 2006 salvado