SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-250534- -00005-0000
Fecha: 2015-04-21 14:21:05 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 257

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 15-088839- -00000-0000
Fecha: 2015-04-21 14:21:06 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 257

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA
República de Colombia
Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DIVISIONAL # 2
DE PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. **13.250.534**

54. TITULO: **ELEMENTOS DE REGULACION DE PLANTAS Y SUS USOS**

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL:

71. SOLICITANTE: **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

DOMICILIO: **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

74. APODERADO: **Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.**

22. BOGOTA, D.C., 20 ABR. 2015

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-250534- -00005-0000

Fecha: 2015-04-21 14:21:05 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 257

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 15-088839- -00000-0000

DIRECCION DE NUI
CONVERSION, DIVISION Y

Fecha: 2015-04-21 14:21:06 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 257

1. Identificación del Trámite

[ ]	Conversión	[X]	División	[ ]	Fusión
[X]	Patente de Invención				
[ ]	Patente de Modelo de Utilidad				
[ ]	Registro de Diseño Industrial				
[ ]	Esquema de Trazado de Circuitos Integrados				

2. Datos del solicitante

Persona Natural [ ] Persona Jurídica [X]

MONSANTO TECHNOLOGY LLC
Nombre o Denominación / Nombre social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro [ ] Pequeña [ ] Mediana [ ] Otra [ ]

Documento de identificación [ ] C.C. [ ] C.E. [ ] NIT [ ] Otro Número _____

Nacionalidad/Pais de constitución		Dirección del titular	Ciudad
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		800 North Lindbergh Boulevard	St. Louis, Missouri 63167

Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

[ ] Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del representante o apoderado

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	39.779.654 de Bogotá	70.819 de C.S.J.
Apellidos y Nombre	Documento de Identificación	T.P. No.

Dirección del representante			Ciudad
Calle 94 A No. 7 A - 09			Bogotá
Dirección electrónica		**No. Fax**	**Número telefónico**
info@castellanosyco.co		7 550158	7 560770

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo general _____

000002

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente	Expediente 13 250534	Expediente
De:	No. de Divisional DOS (2)	De:
A:		A:

5. Comprobante de Pago No. _____ Fecha _____

6. Anexos

- [X] Comprobantes de pago de las tasas
- [X] Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- [ ] Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- [ ] Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- [X] Texto de la descripción, reivindicaciones, resumen y figuras

7. Firma

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Nombre y Apellidos

Margarita Castellanos
Firma

39.779.654 de Bogotá
C.C.

70.819 C.S.J.
T.P.

20 ABR. 2015

000003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0041960

Bogotá D.C., Abril 16 de 2015 - 15:10:59

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	673676500	16/04/2015	4.096.800.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	478.000.00	478.000.00
				$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-250534- -00005-0000
Fecha: 2015-04-21 14:21:05 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 257

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 15-088839- -00000-0000
Fecha: 2015-04-21 14:21:06 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 257

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO 000004

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0042160

Bogotá D.C., Abril 17 de 2015 - 08:54:03

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	4358	16/01/2015	4.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	41983	16/04/2015	28.800.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	32.000.00
				$32.000.00

==========

SON: **TREINTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

-***-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-250534- -00005-0000

Fecha: 2015-04-21 14:21:05 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 257

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 15-088839- -00000-0000

Fecha: 2015-04-21 14:21:06 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 257

PODER

El (los) MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Domiciliados en 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU

Nombran por el presente a XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A. abogadas con oficinas en la Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
b) Para la obtención de registros sanitarios;
c) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy 19 de Diciembre de 2005

en St. Louis, Missouri, USA

por MONSANTO TECHNOLOGY LLC

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Of 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU

hereby grant(s) Power of Attorney to XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS a. attorneys residing at Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia, to obtain the protection of my (our Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
b) For the obtainment of Sanitary registrations;
c) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this 19th December, 2005

in St. Louis, Missouri

by Dennis R. Hoerner

Dennis R. Hoerner
(Notary shall execute on the next page)

(Consular legalization or apostille is required)

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)

NOTARIAL CERTIFICATION (Corporation)

Hoy 19de Dic. del año 2005
compareció (eron) personalmente
DENNIS R. HOERNER

a quienes conozco como la(s) personas que firma(n) en representación de la Sociedad (Compañía) denominada
MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Certifico :

a) Que MONSANTO TECHNOLOGY LLC

es una sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de

b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
St. Louis, Missouri

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad /Compañía.

d) Que el Sr. DENNIS R. HOERNER
esta autorizado para otorgar el presente poder. Lo anterior esta probado por medio de los siguientes documentos, que certifico he visto*

(Ciudad) St. Louis

(Estado) Missouri

Hoy 19 del Diciembre de 2005

(Notario Público)

*Los documentos debe identificarse con fecha y origen.

On this 19 day of Dec. of 2005
personally appeared

000006

Dennis R. Hoerner

whom I know to be the person(s) who signed this document as representative(s) of the Corporation /Company named
Monsanto Technology LLC
I certify:

a) That
Monsanto Technology LLC

is a corporation (Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of

b) That the domicile of said Corporation/Company is
St. Louis, Missouri

c) That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the object set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

d) That Mr. Dennis R. Hoerner
is (are) authorized to grant the present Power of Attorney. The aforementioned was duly proven through the following documents and I duly certify having seen them*:

(City) St. Louis

(State) Missouri

this 19 day of Dec of the year 2005

(Notary Public) Michelle Ludwig

*Documents must be identified with date and origin

NOTARY PUBLIC NOTARY SEAL STATE OF MISSOURI

MICHELLE LUDWIG
My Commission Expires
July 13, 2009
St. Louis County
Commission #05550747

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

000007

1. Country: United States of America

This public document
2. has been signed by MICHELLE LUDWIG
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp of MICHELLE LUDWIG-NOTARY PUBLIC-STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 21ST day of DECEMBER, 2005.
7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 142500
9. Seal/Stamp

10. Signature:



Comm. 48 (01-2005)

de un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia, al igual que la presente.----------

(Adjunto a un documento de Poder otorgado por MONSANTO TECHNOLOGY LLC)

Sello Notarial:

MICHELLE LUDWIG

Mi comisión vence Julio 13, 2009

Condado de St. Louis – Comisión #05550747

APOSTILLA

(Convención de La Haya de octubre 5, 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por Michelle Ludwig
3. actuando en su carácter de Notario Público
4. Lleva el sello de Michelle Ludwig – Notario Público – Estado de Missouri

CERTIFICADO

5. En Jefferson City, Missouri
6. El día 21 de Diciembre de 2005

DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

7. por Robin Carnahan, Secretario de Estado, Estado de Missouri

8. No. 142500

9. Sello (en dorado)

10. Firma:

000009

(fdo) Robin Carnahan

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Febrero 9, 2006.

DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 FEB 13 A 11:55

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

613662

COTEJA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

ELEMENTOS DE REGULACIÓN DE PLANTAS Y SUS USOS

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos N.º 61/467.875, presentada el 25 de marzo de 2011 que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

El listado de secuencias que está contenido en el archivo denominado "38–21_56321–0001.txt", que es de 343.962 bytes (medido en Microsoft Windows®) y se creó el 5 de marzo de 2012, se presenta aquí por presentación electrónica y se incorpora en la presente por referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere al campo de la biología molecular de las plantas y la manipulación de plantas por ingeniería genética y moléculas de ADN de utilidad para modular la expresión génica en plantas.

ANTECEDENTES

Los elementos reguladores son elementos genéticos que regulan la actividad génica por modulación de la transcripción de una molécula de polinucleótido transcribible operativamente ligada. Estos elementos incluyen promotores, líderes, intrones y regiones no traducidas 3´ y son de utilidad en el campo de la biología molecular de plantas y la manipulación de plantas por ingeniería genética.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona nuevos elementos de regulación génica para usar en plantas. La presente invención también proporciona constructos de ADN que comprenden los elementos de regulación. La presente invención también proporciona células de plantas transgénicas, plantas y semillas que comprenden los elementos de regulación. Las secuencias se pueden proporcionar operativamente ligadas a una molécula de polinucleótido transcribible. En una forma de realización, la molécula de polinucleótido transcribible puede ser heteróloga con respecto a una secuencia de regulación provista en la presente. Una secuencia de elementos de regulación provista por la invención se puede definir así, en particular formas de realización, como operativamente ligada a una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga. La presente invención también proporciona métodos de preparación y uso de los elementos de regulación, los constructos de ADN que comprenden los elementos de regulación y las células de plantas transgénicas, plantas y semillas que comprenden los elementos de regulación operativamente ligadas a una molécula de polinucleótido transcribible.

Así, en un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en: a) una secuencia con al menos aproximadamente el 85 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183; b) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183; y c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183, en donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; en donde la secuencia

está ligada operativamente con una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga. En formas de realización específicas, la molécula de ADN comprende al menos aproximadamente el 90 por ciento, al menos aproximadamente el 95 por ciento, al menos aproximadamente el 98 por ciento o al menos aproximadamente el 99 por ciento de identidad de secuencia con la secuencia de ADN de cualquiera de SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183. En ciertas formas de realización de la molécula de ADN, donde la secuencia de ADN comprende un elemento de regulación. En algunas formas de realización, el elemento de regulación comprende un promotor. En particular formas de realización, la molécula de polinucleótido transcribible heteróloga comprende un gen de interés agronómico, tal como un gen capaz de proporcionar resistencia a herbicidas en plantas o un gen capaz de proporcionar resistencia a plagas en plantas.

La invención también proporciona una célula de planta transgénica que comprende un constructo de ADN heterólogo provistoed por la invención, incluyendo una secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183 o uno de sus fragmentos o variantes, en donde dicha secuencia está ligada operativamente con una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga. En ciertas formas de realización, la célula de planta transgénica es una célula de planta monocotiledónea. En otras formas de realización, la célula de planta transgénica es una célula de planta dicotiledónea.

También la invención proporciona una planta transgénica o una parte de ella, que comprende una molécula de ADN provista en la presente, que incluye una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en: a) una secuencia con al menos el 85 por ciento de identidad de secuencia con

cualquiera de SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183; b) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183; y c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183, en donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; en donde la secuencia está ligada operativamente con una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga. En formas de realización específicas, la planta transgénica puede ser una planta de progenie de cualquier generación que comprende la molécula de ADN, respecto a una planta transgénica de partida que comprende la molécula de ADN. También se proporciona en la presente una semilla transgénica que comprende una molécula de ADN de acuerdo con la invención.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método de producción de un producto de consumo que comprende la obtención de una planta transgénica o una parte de ella de acuerdo con la invención y producción de su producto de consumo. En una forma de realización, un producto de consumo de la invención es un concentrado de proteína, aislado de proteína, grano, almidón, semillas, comida, harina, biomasa o aceite de semillas. En otro aspecto, la invención proporciona un producto de consumo usando el método anterior. Por ejemplo, en una forma de realización, la invención proporciona un producto de consumo que comprende una molécula de ADN provista en la presente, que incluye una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en: a) una secuencia con al menos 85 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183; b) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183; y c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183, en donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; en donde la secuencia está

ligada operativamente con una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método de expresión de una molécula de polinucleótido transcribible que comprende la obtención de una planta transgénica de acuerdo con la invención, tal como una planta que comprende una molécula de ADN descrita en la presente y el cultivo de la planta, en donde se expresa un polinucleótido transcribible en la molécula de ADN.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que la palabra "comprender" y sus variaciones, tales como "comprende" y "que comprende", implica la inclusión de una composición establecida, etapa y/o valor o grupo de ella, pero no la exclusión de cualquier otra composición, etapa y/o valor o grupo de ella.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las **FIGS. 1a– 1h** representan la alineación de variantes de tamaño de promotores correspondiente a elementos promotores aislados de la especie de pasto *Andropogon gerardii*. En particular, las Figs. 1a–1h muestran la alineación de la secuencia promotora de 2603 bp P–ANDge.Ubq1–1:1:11 (SEQ ID NO: 2), hallada en el grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción EXP–ANDge.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 1), con secuencias promotoras derivadas por análisis de supresión de P–ANDge.Ubq1–1:1:11. La supresión, por ejemplo, del extremo 5' de P–ANDge.Ubq1–1:1:11, produjo el promotor P–ANDge.Ubq1–1:1:9 (SEQ ID NO: 6), una secuencia de 2114 bp

que se halla dentro de EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5). Otras secuencias promotoras en la Fig. 1 incluyen P–ANDge.Ubq1–1:1:10 (SEQ ID NO: 9), una secuencia de 1644 bp comprendida dentro de EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8); P–ANDge.Ubq1–1:1:12 (SEQ ID NO: 11), una secuencia de 1472 bp comprendida dentro de EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10); P–ANDge.Ubq1–1:1:8 (SEQ ID NO: 13), una secuencia de 1114 bp comprendida dentro de EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12); P–ANDge.Ubq1–1:1:13 (SEQ ID NO: 15), una secuencia de 771 bp comprendida dentro de EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14); y P–ANDge.Ubq1–1:1:14 (SEQ ID NO: 17), una secuencia de 482 bp comprendida dentro de EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16).

Las **FIGS. 2a– 2g** representan la alineación de variantes de promotores aisladas del pasto *Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*). En particular, las FIGS. 2a–2g muestran una alineación de la secuencia promotora de 2536 bp P–ERIra.Ubq1–1:1:10 (SEQ ID NO: 19) (hallada, por ejemplo, dentro del grupo de elementos de expresión de regulación de la transcripción EXP–ERIra.Ubq1 (SEQ ID NO: 18)) con secuencias promotoras derivadas del análisis de supresión de P–ERIra.Ubq1–1:1:10: una secuencia promotora de 2014 bp P–ERIra.Ubq1–1:1:9 (SEQ ID NO: 23); una secuencia promotora de 1525 bp P–ERIra.Ubq1–1:1:11 (SEQ ID NO: 26); una secuencia promotora de 1044 bp P–ERIra.Ubq1–1:1:8 (SEQ ID NO: 28); una secuencia de 796 bp P–ERIra.Ubq1–1:1:12 (SEQ ID NO: 30); y una secuencia de 511 bp P–ERIra.Ubq1–1:1:13 (SEQ ID NO: 32).

Las **FIGS. 3a–3c** representan la alineación de variantes de tamaño de promotores correspondientes a los elementos promotores aislados de la

especie de pasto *Setaria viridis*. En particular, las FIGS. 3a–3c muestran una alineación de una secuencia promotora de 1493 bp, P–Sv.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 34) con promotores derivados del análisis de supresión del extremo 5' de P–Sv.Ubq1–1:1:1: un promotor de 1035 bp de tamaño P–Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 38); y una secuencia promotora de 681 bp P–Sv.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 40).

Las **FIGS. 4a–4e** representan la alineación de las variantes del grupo de elementos de expresión de regulación de la transcripción derivadas del paso *Zea mais* subsp. *mexicana*. En particular, las FIGS. 4a–4e comparan un grupo de elementos de expresión de regulación de la transcripción de 2005 bp denominado EXP–Zm.UbqM1:1:2 (SEQ ID NO: 49) con variante alélica EXP–Zm.UbqM1:1:5 (SEQ ID NO: 53), así como con variantes de tamaño EXP–Zm.UbqM1:1:1 (SEQ ID NO: 41), que tiene un largo de 1922 bps y EXP–Zm.UbqM1:1:4 (SEQ ID NO: 45), que tiene un largo de 1971 bps.

Las **FIGS. 5a–5b** representan la alineación de variantes de tamaño de promotores aisladas del pasto *Sorghum bicolor*. En particular, las FIGS. 5a–5b muestran la alineación del elemento promotor de 791 bp de tamaño, P–Sb.Ubq6–1:1:2 (SEQ ID NO: 60) comprendida dentro del grupo de elementos de expresión de regulación de la transcripción EXP–Sb.Ubq6 (SEQ ID NO: 59), con el elemento promotor de 855 bp P–Sb.Ubq6–1:1:1 (SEQ ID NO: 64) comprendido dentro de EXP–Sb.Ubq6:1:1 (SEQ ID NO: 63).

Las **FIGS. 6a–6c** representan la alineación de variantes de tamaño de promotores correspondientes a elementos promotores aislados del pasto *Setaria italica*. En particular, las FIGS. 6a–6c muestran una alineación de la variante de promotor de 1492 bp P–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 70) con

variante de promotor de 1492 bp P–SETit.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO: 74), elemento promotor de 1034 bp P–SETit.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 76) y elemento promotor de 680 bp P–SETit.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 78).

Las **FIGS. 7a–7b** representan la alineación de variantes de tamaño de promotores y un elemento mejorador correspondiente a los elementos promotores aislados de la especie de pasto *Coix lachrima–jobi*. En particular, las FIGS. 7a y 7b muestran una alineación de la variante de promotor de 837 bp, P–CI.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 80) hallada dentro del grupo de elementos de expresión de regulación de la transcripción EXP–CI.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 79), con un fragmento mejorador derivado de P–CI.Ubq1–1:1:1, denominado E–CI.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 89) que tiene un largo de 798 bp, así como con tres variantes de supresión de terminación 5' de P–CI.Ubq1–1:1:1: un elemento de 742 bp P–CI.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO: 84); un elemento de 401 bp P–CI.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 86); y un elemento promotor mínimo de 54 bp P–CI.Ubq1–1:1:5 (SEQ ID NO: 88).

La **FIG. 8** representa configuraciones de casete transgénicas de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NOS: 1, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 49, 53, 55, 59, 63, 65, 69, 73, 75, 77, 79, 83, 85, 87, 90, 93, 95, 97, 98, 99, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 124, 125, 126, 128, 130, 132, 133, 134, 136, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 180, 181 y 183 son secuencias de grupos de elementos de expresión de regulación de la transcripción o secuencias EXP que comprenden

una secuencia promotora operativamente ligada 5´ con una secuencia líder que está operativamente ligada 5' a una secuencia de intrones.

SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 y 135 son secuencias promotoras.

SEQ ID NOS: 3, 20, 35, 43, 47, 51, 57, 61, 67, 71 y 81 son secuencias líder.

SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 182 son secuencias de intrones.

SEQ ID NO: 89 es la secuencia de un mejorador.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención revelada en la presente proporciona moléculas de polinucleótido que tienen una actividad reguladora de genes beneficiosa de especies vegetales. El diseño, la construcción y el uso de estas moléculas de polinucleótido son proporcionados por la invención. Las secuencias de nucleótidos de estas moléculas de polinucleótido se proporcionan entre SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183. Estas moléculas de polinucleótido son capaces, por ejemplo, de afectar la expresión de una molécula de polinucleótido transcribible operativamente ligada en tejidos vegetales y, en consecuencia, de regular de forma selectiva la expresión o la actividad génica de un producto génico codificado, en plantas transgénicas. La presente invención también proporciona métodos de modificación, su producción y su uso. La invención también proporciona composiciones, células huésped transformadas, plantas

transgénicas y semillas que contienen los promotores y/u otras secuencias de nucleótidos reveiadas y métodos para prepararlas y usarlas.

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

Moléculas de ADN

Tal como se usa en la presente, la expresión "ADN" o "molécula de ADN" se refiere a una molécula de ADN bicatenario de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases de desoxirribonucleótido o una molécula de polinucleótido, leída desde el extremo 5´ (corriente arriba) al extremo 3´ (corriente abajo). Tal como se usa en la presente, la expresión "secuencia de ADN" se refiere a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN. La nomenclatura usada en la presente corresponde a la del título 37 del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos § 1.822 y establecida en las tablas en el WIPO Standard ST.25 (1998), Apéndice 2, Tablas 1 y 3.

Tal como se usa en la presente, la expresión "molécula de ADN aislada" se refiere a una molécula de ADN al menos parcialmente separada de otras moléculas normalmente asociadas con ella en su estado nativo o natural. En una forma de realización, la expresión "aislado" se refiere a una molécula de ADN que está al menos parcialmente separada de algunos de los ácidos nucleicos que normalmente flanquean la molécula de ADN en su estado nativo

o natural. Así, las moléculas de ADN fusionadas con secuencias reguladoras o codificantes con las que no están normalmente asociadas, por ejemplo, como resultado de técnicas recombinantes, son consideradas aisladas en la presente. Estas moléculas se consideran aisladas cuando se integran en el cromosoma de una célula huésped o están presentes en una solución de ácido nucleico con otras moléculas de ADN, porque no están en su estado nativo.

Se pueden usar cualquier cantidad de métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para aislar y manipular una molécula de ADN o su fragmento, revelado en la presente invención. Por ejemplo, la tecnología PCR (reacción de polimerasa en cadena) se puede usar para amplificar una molécula de ADN de partida particular y/o para producir variantes de la molécula original. Las moléculas de ADN o sus fragmentos también se pueden obtener por medio de otras técnicas tales como por sintetización directa del fragmento por medios químicos tal como se practica comúnmente usando un sintetizador automatizado de oligonucleótidos.

Tal como se usa en la presente, la expresión "identidad de secuencia" se refiere a la extensión en la que dos secuencias de polinucleótido óptimamente alineadas o dos secuencias de polipéptidos óptimamente alineadas son idénticas. Una alineación óptima de secuencia es creada por alineación manual de dos secuencias, por ejemplo, una secuencia de referencia y otra secuencia, para maximizar la cantidad de coincidencias de nucleótidos en la alineación de secuencias con inserciones, supresiones o brechas internas de nucleótidos apropiadas. Tal como se usa en la presente, la expresión "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia provista como las secuencias de polinucleótidos de SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183.

Tal como se usa en la presente, la expresión "por ciento de identidad de secuencia" o "por ciento de identidad" o "% de identidad" es la fracción de identidad por 100. La "fracción de identidad" para una secuencia óptimamente alineada con una secuencia de referencia es la cantidad de coincidencias de nucleótidos en la alineación óptima, dividido por la cantidad total de nucleótidos en la secuencia de referencia, por ejemplo, la cantidad total de nucleótidos en la longitud total de la secuencia de referencia entera. Así, una forma de realización de la invención es una molécula de ADN que comprende una secuencia que, cuando está óptimamente alineada con una secuencia de referencia, proporcionada en la presente como SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183, tiene al menos aproximadamente el 85 por ciento identidad, al menos aproximadamente el 90 por ciento identidad, al menos aproximadamente el 95 por ciento identidad, al menos aproximadamente el 96 por ciento identidad, al menos aproximadamente el 97 por ciento identidad, al menos aproximadamente el 98 por ciento identidad o al menos aproximadamente el 99 por ciento identidad con la secuencia de referencia. En formas de realización particulares, tales secuencias se pueden definir por tener actividad reguladora de genes.

Elementos de regulación

Un elemento de regulación es una molécula de ADN que tiene actividad reguladora de genes, es decir, uno que tiene la capacidad de afectar la transcripción y/o la traducción de una molécula de polinucleótido transcribible operativamente ligada. La expresión "actividad reguladora de genes" se refiere así a la capacidad de afectar el patrón de expresión de una molécula de

polinucleótido transcribible operativamente ligada afectando la transcripción y/o la traducción de esa molécula de polinucleótido transcribible operativamente ligada. Tal como se usa en la presente, un grupo de elementos de expresión de regulación de la transcripción o secuencia "EXP" puede estar compuesto por elementos de expresión, tales como mejoradores, promotores, líderes e intrones operativamente ligados. Así, un grupo de elementos de expresión de regulación de la transcripción puede estar compuesto, por ejemplo, por un promotor operativamente ligado 5´ a una secuencia líder que, a su vez, está operativamente ligado 5´ a una secuencia de intrones. La secuencia de intrones puede estar compuesta por una secuencia que comienza en el punto del primer empalme de la unión de intrón/exón de la secuencia nativa y, además, puede estar compuesta por un fragmento líder pequeño que comprende el segundo empalme de la unión de intrón/exón de modo de proporcionar un apropiado procesamiento de intrón/exón para facilitar la transcripción y el procesamiento adecuado del transcripto resultante. Los líderes e intrones pueden afectar positivamente la transcripción de una molécula de polinucleótido transcribible operativamente ligada, así como la traducción del ARN transcripto resultante. La molécula de ARN preprocesada comprende líderes e intrones, que pueden afectar el procesamiento postranscripcional del ARN transcripto y/o la exportación de la molécula de ARN transcripto desde el núcleo celular al citoplasma. Después del procesamiento postranscripcional de la molécula de ARN transcripta, la secuencia líder se puede retener como parte del ARN mensajero final y puede afectar positivamente la traducción de la molécula de ARN mensajero.

Los elementos de regulación tales como promotores, líderes, intrones y regiones de terminación de la transcripción (o 3´ UTRs) son moléculas de ADN que tienen actividad reguladora de genes y desempeñan una parte integral en la expresión general de genes en células vivas. La expresión "elemento regulador" se refiere a una molécula de ADN que tiene actividad reguladora de genes, es decir, una que tiene la capacidad de afectar la transcripción y/o la traducción de una molécula de polinucleótido transcribible operativamente ligada. Los elementos de regulación aislador tales como promotores y líderes que funcionan en plantas son de utilidad, en consecuencia, para modificar los fenotipos de plantas a través de métodos de ingeniería genética.

Los elementos de regulación se pueden caracterizar por sus efectos de patrón de expresión (cualitativa y/o cuantitativamente), por ejemplo, efectos positivos o negativos y/o constitutivos u otros efectos tales como su ciclo temporal, espacial, de desarrollo, tisular, medioambiental, fisiológico, patológico, celular y/o patrón de expresión de respuesta química y cualquier combinación de ellos, así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas. Un promotor es de utilidad como un elemento de regulación para modular la expresión de una molécula de polinucleótido transcribible operativamente ligada.

Tal como se usa en la presente, un "patrón de expresión génica" es cualquier patrón de transcripción de una molécula de ADN operativamente ligada en una molécula de ARN transcripta. La molécula de ARN transcripta se puede traducir para producir una molécula de proteína o puede proporcionar una molécula de ARN antisentido u otra molécula de ARN de regulación, tales como dsARN, tARN, rARN, miARN, y similares.

Tal como se usa en la presente, la expresión "expresión de proteína" es cualquier patrón de traducción de una molécula de ARN transcripta en una molécula de proteína. La expresión de proteína se puede caracterizar por sus calidades temporal, espacial, de desarrollo o morfológica, así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas.

Tal como se usa en la presente, la expresión "promotor" se refiere en general a una molécula de ADN que está implicada en el reconocimiento y la unión de ARN polimerasa II y otras proteínas (factores de transcripción transactivos) para iniciar la transcripción. Un promotor se puede aislar inicialmente a partir de la región no traducida 5′ (5′ UTR) de una copia genómica de un gen. De forma alternativa, los promotores pueden ser moléculas de ADN sintéticamente producidas o manipuladas. Los promotores también pueden ser quiméricos, es decir, un promotor producido a través de la fusión de dos o más moléculas de ADN heterólogas. Los promotores de utilidad en la práctica de la presente invención incluyen SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 y 135 o sus fragmentos o variantes. En formas de realización específicas de la invención, tales moléculas y cualquiera de sus variantes o derivados tal como se describe en la presente, también se definen por comprender actividad promotora, es decir, son capaces de actuar como un promotor en una célula huésped como en una planta transgénica. En otras formas de realización específicas, un fragmento se puede definir por exhibir actividad promotora poseída por la molécula promotora inicial de la que se deriva o un fragmento puede comprender un "promotor mínimo" que proporciona un nivel basal de transcripción y está compuesto por una caja

TATA o secuencia equivalente para reconocimiento y unión del complejo de ARN polimerasa II para inicio de la transcripción.

En una forma de realización, se proporcionan fragmentos de una secuencia promotora que se describe en la presente. Los fragmentos del promotor pueden comprender actividad promotora, como se describió antes, y pueden ser útiles solos o en combinación con otros promotores y fragmentos del promotor, tal como en la construcción de promotores quiméricos. En formas de realización específicas, se proporcionan fragmentos de un promotor que comprenden al menos aproximadamente 50, 95, 150, 250, 500, 750, o al menos aproximadamente 1000 nucleótidos contiguos, o más largos, de una molécula de polinucleótido que tiene la actividad promotora descripta en la presente.

Las composiciones derivadas de cualquiera de los promotores presentados como las SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 y 135, tales como internos o supresiones 5', por ejemplo, se pueden producir usando métodos conocidos en la técnica para aumentar o alterar la expresión, que incluye por la eliminación de elementos que tienen efectos positivos o negativos sobre la expresión; duplicación de elementos que tienen efectos positivos o negativos sobre la expresión; y/o duplicación o eliminación de elementos que tienen efectos específicos en tejido o células sobre la expresión. Las composiciones derivadas de cualquiera de los promotores presentados como las SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 y 135 compuestas de supresiones 3' en que el elemento de la caja TATA o secuencia

equivalente de este y secuencia corriente abajo se elimina, se pueden usar por ejemplo, para obtener elementos potenciadores. Además se pueden realizar supresiones para eliminar cualquiera de los elementos que tienen efectos positivos o negativos; específicos de tejido; específicos de célula; o específicos del ritmo (tales como, pero sin limitación, ritmos circadianos) sobre la expresión. Cualquiera de los promotores presentados como las SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 y 135 y fragmentos o potenciadores derivados de estos se pueden usar para obtener composiciones del elemento regulatorio transcripcional quimérico de cualquiera de los promotores presentados como las SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 y 135 y los fragmentos o potenciadores derivados de estos ligados operativamente a otros potenciadores y promotores. La eficacia de las modificaciones, duplicaciones o supresiones descriptas en la presente sobre los aspectos de expresión deseados de un transgén particular se puede analizar empíricamente en ensayos de planta estables y transitorios, tales como los descriptos en los ejemplos de trabajo de la presente, de modo de validar los resultados, que pueden variar de acuerdo con los cambios realizados y el objetivo del cambio en la molécula de partida.

Tal como se usa en la presente, el término "líder" se refiere a una molécula de ADN aislada de la región 5' no traducida (5' UTR) de una copia genómica de un gen y se define generalmente como un segmento de nucléotido entre el sitio de inicio de transcripción (TSS) y el sitio de comienzo de la secuencia codificadora. Alternativamente, los líderes se pueden ser

elementos de ADN producidos o manipulados sintéticamente. Un líder de planta se puede usar como elemento regulatorio 5' para modular la expresión de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. Las moléculas líder se pueden usar con un promotor heterólogo o con su promotor nativo. Las moléculas promotoras de la presente invención en consecuencia se pueden ligar operativamente a su líder nativa o se pueden ligar operativamente a su líder heteróloga. Las líderes útiles en la práctica de la presente invención incluyen las SEQ iD NOS: 3, 20, 35, 43, 47, 51, 57, 61, 67, 71 y 81 o sus fragmentos o variantes. En formas de realización específicas, se pueden proporcionar tales secuencias que se definen como capaces de actuar como un líder en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo, una célula de planta transgénica. En una forma de realización tales secuencias se decodifican como que comprenden actividad líder.

Las secuencias líder (5´ UTR) presentadas como las SEQ ID NOS: 3, 20, 35, 43, 47, 51, 57, 61, 67, 71 y 81 pueden estar compuestas de elementos regulatorios o pueden adoptar estructuras secundarias que pueden tener un efecto sobre la transcripción o traducción de un transgén. Las secuencias líder presentadas como las SEQ ID NOS: 3, 20, 35, 43, 47, 51, 57, 61, 67, 71 y 81 se pueden usar de acuerdo con la invención para obtener elementos regulatorios quiméricos que afectan la transcripción o traducción de un transgén. Además, las secuencias líder presentadas como las SEQ ID NOS: 3, 20, 35, 43, 47, 51, 57, 61, 67, 71 y 81 se pueden usar para obtener secuencias quiméricos que que afectan la transcripción o traducción de un transgén.

La introducción de un gen extraño en una planta huésped no siempre produce una alta expresión de l gen ingresante. Además, si se trata con rasgos

complejos, algunas veces es necesario modular varios genes con patrón de expresión espacial o temporariamente diferente. Los intrones pueden proporcionar principalmente tal modulación. Sin embargo, se ha mostrado que el uso múltiple del mismo intrón en una planta presente desventajas. En los casos que es necesario tener una colección de elementos de control básicos para la construcción de elementos de ADN recombinantes apropiados. Como la colección de intrones disponibles conocidos en la técnica con propiedades potenciadoras de la expresión es limitada, se necesitan alternativas.

Las composiciones derivadas de algunos de los intrones presentados como las SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 182 pueden estar compuestas de supresiones internas o duplicaciones de elementos regulatorios cis; y/o alteraciones de las secuencias 5´ y 3´ que comprenden las uniones de empalme intrón/exón que se pueden usar para aumentar la expresión o especificidad de expresión cuando se ligan operativamente a un promotor + líder o promotor quimérico + líder y secuencia codificadora. Las alteraciones de las regiones 5´ y 3´ que comprenden la unión de empalme intrón/exón también se pueden realizar para reducir el potencial para la introducción de falsos codones de iniciación y detención producidos en el transcripto resultante después del procesamiento y empalme del ARn mensajero. Los intrones se pueden analizar empíricamente como se describe en los ejemplos de trabajo para determinar el efecto del intrón sobre la expresión de un transgén.

De acuerdo con la invención un promotor o fragmento de promotor se puede analizar por la presencia de elementos promotores conocidos, es decir,

características de la secuencia de ADN, tales como una caja TATA y otros motivos del sitio de unión del factor de transcripción. Los expertos en la técnica pueden usar la identificación de tales elementos promotores conocidos para diseñar variantes del promotor que tienen un patrón de expresión similar al promotor original.

Como se usa en la presente, el término "potenciador" o "elemento potenciador" se refiere a un elemento regulador de transcripción de acción cis, a.k.a. elemento cis, que confiere un aspecto del patrón de expresión total, pero solo es usualmente insuficiente para dirigir la transcripción, de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente. A diferencia de los promotores, los elementos potenciadores usualmente no incluyen un sitio de inicio de transcripción (TSS) o caja TATA. Un promotor naturalmente puede comprender uno o más elementos potenciadores que afectan la transcripción de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente. Un elemento potenciador aislado también se puede fusionar a un promotor para producir un elemento cis del promotor quimérico, que confiere un aspecto de la modulación global de la expresión del gen. Un promotor o fragmento de promotor puede comprender uno o más elementos potenciadores que afectan la trascripción de los genes ligados operativamente. Mucho elementos potenciadores del promotor se consideran que se unen a las proteínas de unión al ADN y/o afectan la topología ADN, producen conformaciones locales que permiten o restringen selectivamente el acceso de ARN polimerasa al molde del ADN o que facilitan la apertura selectiva de la doble hélice en el sitio de iniciación de la transcripción. Un elemento potenciador puede actuar para unir los factores de transcripción que regulan la transcripción. Algunos elementos potenciadores

unen más de un factor de transcripción, y los factores de transcripción pueden interactuar con afinidades diferentes con más de un dominio potenciador. Los elementos potenciadores se pueden identificar por numerosas técnicas, que incluyen el análisis de la supresión, *es decir,* suprimir uno o más nucleótidos del extremo 5' o interno a un promotor; el análisis de la proteína de unión al ADN usando señalización con ADNsa I, interferencia de metilación, ensayos de cambio de movilidad de electroforesis, señalización genómica *in vivo* por PCR mediada por ligamiento y otros ensayos convencionales o por análisis de semejanza de secuencias de ADN con motivos de elementos cis conocidos o elementos potenciadores como una secuencia blanco o motivo blanco por métodos de comparación de secuencias de ADN convencionales, tales como BLAST. La estructura fina de un dominio potenciador se puede estudiar adicionalmente por mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o por otros métodos convencionales. Los elementos potenciadores se pueden obtener por síntesis química o por aislamiento de los elementos regulatorios que incluyen dichos elementos, y estos se pueden sintetizar con nucleótidos flanqueantes adicionales que contienen sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar la manipulación de la subsecuencia. En consecuencia, el diseño, construcción, y uso de elemento potenciadores de acuerdo con los métodos descriptos en la presente para modular la expresión de moléculas transcribibles ligadas operativamente están abarcados por la presente invención.

En las plantas, la inclusión de algunos intrones en los constructos génicos lleva a aumento del ARNm y acumulación de proteína relativa a constructos que carecen del intrón.

Este efecto ha sido denominado "aumento mediado por intrón" (IME) de la expresión del gen (Mascarenhas *et al.*, (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:913–920). Los intrones conocidos para estimular la expresión en plantas se ha identificado en los genes de maíz (*por ejemplo* tubA1, Adh1, Sh1, Ubi1 (Jeon *et al.* (2000) *Plant Physiol.* 123:1005–1014; Callis *et al.* (1987) *Genes Dev.* 1:1183–1200; Vasil *et al.* (1989) *Plant Physiol.* 91:1575–1579; Christiansen *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675–689) y in rice genes (*por ejemplo* salt, *tpi:* McElroy *et al.*, *Plant Cell* 2:163–171 (1990); Xu *et al.*, *Plant Physiol.* 106:459–467 (1994)). De modo similar, se ha hallado que los intrones de genes de plantas dicotiledóneas como los petunia (*por ejemplo rbcS*), papa (*por ejemplo st–ls1*) y de *Arabidopsis thaliana* (*por ejemplo ubq3* y *pat1*) elevan las tasas de expresión génica (Dean *et al.* (1989) *Plant Cell* 1:201–208; Leon *et al.* (1991) *Plant Physiol.* 95:968–972; Norris *et al.* (1993) *Plant Mol Biol* 21:895–906; Rose y Last (1997) *Plant J.*11:455–464). Se ha mostrado que las supresiones o mutaciones dentro de los sitios de empalme de un intrón reducen la expresión del gen, lo que indica que se podría necesitar el empalme para el IME (Mascarenhas *et al.* (1990) *Plant Mol Biol.* 15:913–920; Clancy y Hannah (2002) *Plant Physiol.* 130:918–929). Sin embargo se ha demostrado que este empalme per se no se requiere para un determinado IME en las plantas dicotiledóneas por mutaciones puntuales dentro de los sitios de empalme del gen pat1 de *A. thaliana* (Rose y Beliakoff (2000) *Plant Physiol.* 122:535–542).

El aumento de la expresión del gen por los intrones no es un fenómeno general ya que algunas inserciones de intrón en los casetes de expresión recombinante no aumentan la expresión (*por ejemplo* intrones de genes dicotiledóneos (gen *rbcS* de arveja, gen faseolino de poroto y el gen *stls–1* de

Solanum tuberosum) y los intrones de los genes del maíz (gen *adh1* el noveno intrón, gen *hsp81* el primer intrón)) (Chee *et al.* (1986) *Gene* 41:47–57; Kuhlemeier *et al.* (1988) *Mol Gen Genet* 212:405–411; Mascarenhas *et al.* (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:913–920; Sinibaldi y Mettler (1992) en WE Cohn, K Moldave, eds, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol 42. Academic Press, New York, pp 229–257; Vancanneyt *et al.* 1990 *Mol. Gen. Genet.* 220:245–250). En consecuencia, no todo intrón se puede emplear para manipular el nivel de expresión génica de los genes no endógenos o genes endógenos en las plantas transgénicas. Cuáles características o rasgos de secuencia específicos deben estar presentes en un intrón para aumentar la tasa de expresión de un gen dado no es conocido en la técnica previa y por ende a partir de la técnica previa no es posible predecir si un intrón de una planta dada, cuando se usa en forma heteróloga, causará aumento de expresión en el nivel del ADN o en el nivel del transcripto (IME).

Como se usa en la presente, el término ""quimérico" se refiere a un ADN único producido por la fusión de una primera molécula de ADN a una segunda molécula de ADN, donde ni la primera ni la segunda molécula de ADN se hubieran.

hallado normalmente en esta configuración, es decir, fusionados entre sí. La molécula quimérica de ADN es en consecuencia una nueva molécula de ADN que de otro modo no se hallaría normalmente en la naturaleza. Como se usa en la presente, el término "promotor quimérico" se refiere a un promotor producido a través de dichas manipulaciones de las moléculas de ADN. Un promotor quimérico puede combinar dos o más fragmentos de ADN; un ejemplo debería ser la fusión de un promotor a un elemento potenciador. En

consecuencia, el diseño, construcción y uso de los promotores quiméricos de acuerdo con los métodos descriptos en la presente para modular la expresión de moléculas de polinucleótidos transcribibles unidas operativamente están comprendidos en la presente invención.

Como se usa en la presente, el término "variante" se refiere a una segunda molécula de ADN que está en una composición similar, pero no idéntica, a una primera molécula de ADN y aún la segunda molécula de ADN todavía mantiene la funcionalidad general, es decir patrón de expresión igual o similar, de la primera molécula de ADN. Una variante puede ser una versión más corta o truncada de la primera molécula de ADN y/o una versión alterada de la secuencia de la primera molécula de ADN, tales como uno con diferentes sitios de restricción enzimática y/o supresiones, sustituciones y/o inserciones completas. Una "variante" también puede abarcar un elemento regulatorio que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, supresión y/o inserción de uno o más nucleótidos de una secuencia de referencia, donde el elemento regulatorio derivado tiene más o menos o equivalente actividad transcripcional o traduccional que la correspondiente molécula regulatoria original. El elemento regulatorio "variantes" también abarcará variantes que surgen de mutaciones que se producen naturalmente en la transformación de células bacterianas y vegetales. En la presente invención, una secuencia de polinucleótidos provista como SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183 se puede usar para crear variantes que son de composición similar, pero no idénticas a, la secuencia de polinucleótidos del elemento regulatorio original, pero que aún mantiene la funcionalidad general, es decir, patrón de expresión igual o similar del promotor original. La producción de dichas variantes de la presente

invención está dentro de la experiencia del arte a la luz de la descripción y está comprendida en el alcance de la presente invención. Las "variantes" del elemento regulatorio quimérico comprenden los mismos elementos constituyentes que una secuencia de referencia pero los elementos constituyentes que comprenden el elemento regulatorio quimérico se pueden ligar operativamente por varios métodos conocidos en la técnica, digestión con enzima de restricción y ligamiento, clonación independiente del ligamiento, ensamblaje modular de los productos de PCR durante la amplificación, o síntesis química directa del elemento regulatorio así como otros métodos conocidos en la técnica. La "variante" del elemento regulatorio quimérico puede estar compuesta de los mismos o variantes de los mismos elementos constituyentes de la secuencia de referencia pero difieren en la secuencia o secuencias que comprenden la secuencia o secuencias de ligamiento que permiten que las partes constituyentes se liguen operativamente. En la presente invención, una secuencia de polinucleótidos provistas como las SEQ ID NO: 1–158 y 180–183 proporciona una secuencia de referencia donde los elementos constituyentes que comprenden la secuencia de referencia se pueden unir por métodos conocidos en la técnica y pueden comprender sustituciones, supresiones y/or inserciones de uno o más nucleótidos o mutaciones que se producen naturalmente en la transformación de células bacterianas y plantas.

Constructos

Como se usa en la presente, el término "constructo" significa cualquier molécula de polinucleótido recombinante tal como un plásmido, cósmido, virus,

molécula de polinucleótido de replicación autónoma, fago o molécula de polinucleótido de ADN o ARN monocatenario o bicatenario lineal o circular, derivado de cualquier fuente, capaz de la integración genómica o replicación autónoma, que comprende una molécula de polinucleótido donde una o más moléculas de polinucleótidos se han unido de una manera funcionalmente operativa, *es decir,* unida operativamente. Tal como se usa en la presente, el término "vector" significa cualquier constructo de polinucleótidos recombinante que se puede usar para el fin de la transformación, *es decir,* la introducción de ADN heterólogo en una célula huésped. El término incluye un casete de expresión aislado de alguna de las moléculas mencionadas anteriormente.

Como se usa en la presente, el término "unido operativamente" se refiere a una primera molécula conectada con una segunda molécula, donde las moléculas de polinucleótidos se disponen de modo que la primera molécula afecte la función de la segunda molécula. Las dos moléculas pueden ser parte o no de una única molécula de polinucleótido contigua y puede ser o no adyacentes. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribiblr si el promotor modula la transcripción de la molécula de polinucleótido transcrible en una célula. Un líder, for ejemplo, está unido operativamente a la secuencia codificadora cuando es capaz de actuar como un líder para el polipéptido codificado por la secuencia codificadora.

Los constructos de la presente invención se pueden prorporcionar en una forma de realización como constructos de ADN límite doble del plásmido Ti que tienen regiones del límite derecho (RB o AGRtu.RB) y límite izquierdo (LB o AGRtu.LB) del plásmido Ti aislado de *Agrobacterium tumefaciens* que

comprenden un ADN–T, que junto con las moléculas de transferencia provistas por las células de *Agrobacterium*, permiten la integración del ADN–T en el genoma de una célula vegetal (ver, por ejemplo, Patente U.S 6.603.061, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). Los constructos también pueden contener los segmentos de ADN del esqueleto del plásmido que proporcionan funciones de replicación y selección de antibióticos en células bacterianas, por ejemplo, un origen de replicación de *Escherichia* tal como ori322, un origen de replicación de amplio rango de huésped tal como *oriV* o oriRi, y una región codficadora para un marcador seleccionable tal como Spec/Strp que codifica una Tn7 aminoglicósido adeniltransferasa *(aadA)* que confiere resistencia a espectinomicina o estreptomicina, o un gen de marcador seleccionable a gentamicina (Gm, Gent). En la transformación de plantas, la cepa bacteriana huésped es con frecuencia *Agrobacterium tumefaciens* ABI, C58, o LBA4404, sin embargo, otras cepas conocidas para los expertos en la técnica de transformación de plantas pueden ser útiles en la presente invención.

Se conocen métodos en la técnica para ensamblar y e introducir constructos en una células de manera tal que la molécula de polinucleótido transcribible se transcriba en una molécula de ARNm funcional que se traduce y expresa como un producto de proteína. En la práctica de la presente invención, las composiciones y métodos convencionales para preparar y usar constructos y células huésped son bien conocidos por los expertos en la técnica, ver por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edición Volumes 1, 2, y 3 (2000) J.F. Sambrook, D.W. Russell, y N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Los métodos para preparar vectores recombinantes

particularmente adecuados para la transformación de plantas incluyen, sin limitación, los descriptos en las Patentes U.S Nos. 4.971.908, 4.940.835, 4.769.061 y 4.757.011, en su totalidad. Estos tipos de vectores también han sido revisados en la bibliografía científica (Rodriguez, et al. Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors y Their Uses, Butterworths, Boston, 1988; Glick *et al., Methods in Plant Molecular Biology y Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993). Los vectores típicos útiles para la expresión de ácidos nucleicos en plantas superiores son bien conocidos en la técnica e incluyen vectores derivados del plásmido derivados del plásmido inductor del tumor (Ti) de Agrobacterium tumefaciens (Rogers, *et al., Meth. In Enzymol*, 153: 253–277, 1987).

También se han descripto otros vectores recombinantes útiles para la transformación de plantas, que incluye el vector de control de transferencia de pCaMVCN en la bibliografía científica (ver, por ejemplo, Fromm, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5824–5828 (1985)).

Se pueden incluir varios elementos regulatorios en un constructo que incluye alguno de los provistos en la presente. Se puede proporcionar cualquiera de estos elementos regulatorios en combinación con otro elemento regulatorio. Dichas combinaciones se pueden diseñar o modificar para producir características reguladoras deseables. En una forma de realización, los constructos de la presente invención normalmente comprenden al menos un elemento regulatorio unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente a una molécula de polinucleótido de terminación de transcripción 3'.

Los constructor de la presente invención pueden incluir cualquier promotor o líder provisto en la presente o conocido en la técnica. Por ejemplo, un promotor de la presente invención se puede unir operativamente a un líder 5' no traducido heterólogo tal como uno derivado de los genes de la proteína del shock térmico (ver, por ejemplo, Patente U.S N.º 5.659.122 y Patente U.S N.º 5.362.865). En forma alternativa, un líder de la presente invención se puede unir operativamente a un promotor heterólogo tal como el promotor del transcripto del virus del mosaico de coliflor 35S (ver, por ejemplo, Patente U.S N.º 5.352.605).

Como se usa en la presente, el término "intrón" se refiere a una molécula de ADN que se puede aislar o identificar de la copia genómica de un gen y se puede definir generalmente como una región empalmada durante el procesamiento del ARNm antes de la traducción. Alternativamente, los intrones pueden ser elementos de ADN producidos o manipulados sintéticamente. Un intrón puede contener elementos potenciadores que efectúan la transcripción de los genes unidos operativamente. Un intrón se puede usar como un elemento regulatorio para modular la expresión de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. Un constructo de ADN puede comprender un intrón, y el intrón puede o no ser heterólogo con respecto a la secuencia de la molécula de polinucleótido transcribible. Los ejemplos de intrones en la técnica incluyen el intrón de actina de arroz (Patente estadounidense No. 5.641.876) y el intrón de HSP70 de maíz (patente estadounidense No. 5.859.347). Los intrones útiles en la práctica de la presente invención incluyen las SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131,

138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 182. Además, cuando se modifican las secuencias límite intrón/exón, puede ser preferible evitar el uso de la secuencia de nuecleótidos AT o el nucleótido A justo antes del extremo 5' del sitio de empalme (GT) y el nucleótido G o la secuencia de nucleótidos TG, respectivamente justo después del extremo 3' del sitio de empalme (AG) para eliminar el potencial de codones de inicio deseados que se forman durante el procesamiento del ARN mensajero en el transcripto final. La secuencia alrededor de los sitios de unión de empalme del extremo 5´ o 3´ del intrón en consecuencia se puede modificar de este modo.

Como se usa en la presente, el término "molécula de terminación de transcripción 3'" o "UTR 3'" se refiere a una molécula de ADN que se usa durante la transcripción para producir la región no traducida 3' (UTR 3') de una molécula de ARNm. La región no traducida 3' (UTR 3') de una molécula de ARNm se puede generar por la escisión específica y poliadenilación 3' de cola poliA a.k.a. Una UTR 3' puede estar unida operativamente y ubicada corriente debajo de una molécula de polinucleótido transcribible y puede incluir polinucleótidos que proporcionan una señal de poliadenilación y otras señales regulatorias capaces de afectar la transcripción, procesamiento de ARNm o expresión génica. Se considera que las colas polyA funcionan en la estabilidad del ARNm y en la iniciación de la traducción. Los ejemplos de moléculas de terminación de transcripción 3' en la técnica son la región 3' de nopalina sintasa (ver, Fraley, *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4803–4807 (1983)); región 3' de hspl7 de trigo, y región 3' de subunidad pequeña de arveja rubisco), región 3' de algodón E6 3' (Patente U.S 6.096.950); regiones 3' descriptas en WO0011200A2,; y la UTR 3' de coixina (Patente U.S. N.°. 6.635.806).

Las UTR 3' normalmente tienen un uso beneficioso para la expresión recombinante de genes específicos. En sistemas animales, se ha definido bien una maquinaria de UTR 3' (*por ejemplo* Zhao *et al.*, *Microbiol Mol Biol Rev* 63:405–445 (1999); Proudfoot, *Nature* 322:562–565 (1986); Kim *et al.*, *Biotechnology Progress* 19:1620–1622 (2003); Yonaha y Proudfoot, *EMBO J.* 19:3770–3777 (2000); Cramer *et al.*, *FEBS Letters* 498:179–182 (2001); Kuerstem y Goodwin, *Nature Reviews Genetics* 4:626–637 (2003)). La terminación efectiva de la transcripción de ARN es necesaria para evitar la transcrición no deseada de las secuencias no relacionadas con el rasgo (corriente abajo), que pueden interferir con el rendimiento del rasgo. La disposición de los múltiples casetes de de expresión del gen en proximidad local entre sí (*por ejemplo,* dentro de un ADN–T) puede causar la supresión de la expresión de un o más genes en dicho constructo en comparación con las inserciones independientes (Padidam y Cao, *BioTechniques* 31:328–334 (2001). Esto puede interferir en la obtención de niveles de expresión adecuados, por ejemplo en los casos en que se desea la expresión fuerte del gen de todos los casetes.

En las plantas, no se conocen secuencias de la señal de poliadenilación claramente definidas. Hasegawa *et al., Plant J.* 33:1063–1072, (2003)) no pudieron identificar secuencias de la señal de poliadenilación conservadas tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* systems de *Nicotiana sylvestris* y determinar la real longitud del transcripto primario (no poliadenilado). Un UTR 3' débil tiene el potencial de generar ultra–lectura, que puede afectar la expresión de los genes ubicados en los casetes de expresión vecinos (Padidam y Cao, *BioTechniques* 31:328–334 (2001)). El control apropiado de la

terminación de transcripción puede evitar la ultralectura en las secuencias (*por ejemplo* otros casetes de expresión) localizados corriente abajo y también puede permitir el reciclado eficiente de la ARN polimerasa, para mejorar la expresión del gen. La terminación de la trascripción eficiente (liberación de ARn polimerasa II del ADN) es un prerrequisito para la re–iniciación de la transcripción y de este modo afecta el nivel del transcripto total. Después de la terminación de la transcripción, el ARNn maduro se libera del sitio de síntesis y el molde al citoplasma. Los ARNm eucarióticos se acumulan como formas poli(A) *in vivo*, de modo que es difícil detectar los sitios de terminación de transcripción por métodos convencionales. Sin embargo, la predicción de la UTR 3' funcional y eficiente por métodos bioinformáticas es difícil ya que no existen secuencias conservadas que pueda permitir la predicción sencilla de un UTR 3' efectiva.

Desde un punto de vista práctico, normalmente es beneficioso que una 3´ UTR usada en un casete del transgén posea las siguientes características. La UTR 3´ debe poder terminar en forma eficiente y efectiva la transcripción del transgén y evitar la ultra lectura del transcripto en cualquier secuencias de ADN vecina que puede estar compuesta de otro casete del transgén como en el caso de múltiples casetes que residen en un ADN–T o el ADN cromosómico vcino en que se ha insertado el ADN–T. La UTR 3´ no debe causar una reducción de la actividad de transcripción impartida por el promotor, líder e intrones que se usan para dirigir la expresión del transgén. En biotecnología vegetal, la UTR 3´ a menudo se usa para cebar las reacciones de amplificación del ARN transcripto en forma inversa extraído de la planta transformada y se usa para (1) evaluar la actividad de trascripción o expresión del casete del

transgénuna vez integrado en el cromosoma de planta; (2) evaluar el número de copias de las inserciones dentro del ADN de la planta; y (3) evaluar la cigosidad de la semilla resultante después de la cruza. La UTR 3´ también se usa en las reacciones de amplificación del ADN extraído de la planta transformada para caracterizar la integridad del casete insertado.

La UTR 3´ útil para proporcionar la expresión de un transgén en las plantas se pueden identificar sobre la base de la expresión de las marcas de secuencia expresada (EST) en las bibliotecas se ADNc hechas de ARN mensajero aislado de semillas, flores y otros tejidos derivados de tallo azul gigante (*Andropogon gerardii*), carricera (*Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*)), cola de zorro (*Setaria viridis*), Teosinte (*Zea mays subsp. mexicana*), mijo de cola de zorro (*Setaria italica*), y lágrimas de Job (*Coix lacryma–jobi*). Las bibliotecas de ADNc se obtienen de tejidos aislados de especies de planta seleccionadas usando métodos conocidos por los expertos en la técnica de tejido de flor, semilla, hojas y raíz. Los ADNc resultantes se secuencian usando varios métodos de secuenciación conocidos en la técnica. Los EST resultantes se ensamblan en grupos usando software bioinformática tal como c_ref_assemble_complete versión 2.01.37139 (CLC bio USA, Cambridge, Massachusetts 02142). La abundancia de transcriptos de cada grupo se determina por el recuento del número de lecturas de ADNc para cada grupo. La UTR 3' identificada puede estar compuesta de la secuencia derivada de la secuencia de ADNc así como una secuencia derivada del ADN genómico. La secuencia de ADNc se usa para diseñar los cebadores, que luego se usan con bibliotecas GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) construidas siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 3´ de

la secuencia de ADN genómico correspondiente para proporcionar una secuencia de terminación más larga. Los análisis de la abundancia de transcripto relativa sea como recuentos directos o recuentos normalizados de las lecturas secuencia observada para cada biblioteca de tejido se pueden usar para inferir propiedades acerca de los patrones de expresión. Por ejemplo, se puede hallar alguna UTR 3' en transcriptos observados en mayor abundancia en el tejido foliar en oposición a las hojas. Esto es sugestivo que el transcripto está altamente expresado en raíz y que las propiedades de expresión en raíz se pueden atribuir a la regulación de la transcripción del promotor, el líder, los intrones o la 3' UTR. El ensayo empírico de la UTR 3' identificada por las propiedades de expresión dentro de los tipos específicos de órganos, tejidos o células puede producir la identificación de la UTR 3' que potencia la expresión en estos tipos específicos de órganos, tejidos o células.

Los constructos y vectores también pueden incluir una secuencia codificadora de un péptido de tránsito que expresa un péptido ligado que es útil para dirigir un producto proteico, en particular, a un cloroplasto, leucoplasto u otra organela del plástido; mitocondria; peroxisoma; vacuola; o una localización extracelular. Para las descripciones del uso de péptidos de tránsito de cloroplastos, ver Patente U.S. N.º 5.188.642 y Patente U.S N.º 5.728.925. Muchas proteínas localizadas en el cloroplasto se expresan en genes nucleares como precursores y se dirigen al cloroplasto por un péptido de tránsito del cloroplasto (CTP). Los ejemplos de dichos péptidos de cloroplasto incluyen, pero sin limitación, los asociados con la subunidad pequeña (SSU) de ribulosa–1,5,–bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidorreductasa, el complejo de recolección leve de la proteína I y proteína II, tiorredoxina F,

enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS), y péptidos de tránsito descriptos en la Patente U.S N.º 7.193.133. Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que las proteínas no cloroplásticas se pueden dirigir al cloroplasto por el uso de las proteínas de fusión con un CTP heterólogo y que el CTP es suficiente para dirigir una proteína al clorplasto. La incorporación de un péptido de tránsito del cloroplasto adecuado tal como EPSPS CTP (CTP2) de *Arabidopsis thaliana* (Ver, Klee *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 210:437–442 (1987)) o el EPSPS CTP (CTP4) de *Petunia hybrida* (ver, della–Cioppa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:6873–6877 (1986)) ha demostrado que dirigir secuencias de proteína de EPSPS heterólogas a los cloroplastos de las plantas transgénicas (Ver, Patentes U.S Nos. 5.627.061; 5.633.435; y 5.312.910 y EP 0218571; EP 189707; EP 508909; y EP 924299).

Moléculas de polinucleótidos transcribibles

Como se usa en la presente el término "molécula de polinucleótido transcribible" se refiere a cualquier molécula de ADN capaz de transcribirse en una molécula ARN, que incluye pero sin limitación las que tienen secuencias codificadoras de proteína y las que producen moléculas de ARN que tienen secuencias útiles para la supresión génica. Un "transgén" se refiere a una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga a una célula huésped al menos con respecto a su localización en el genoma y/o una molécula de polinucleótido transcribible incorporada artificialmente en un genoma de la célula huésped en la actual o alguna generación previa de la célula.

Un promotor de la presente invención puede estar unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible que es heteróloga con respecto a la molécula del promotor. Como se usa en la presente, el término "heterólogo"

se refiere a una combinación de dos o más moléculas de polinucleótidos cuando dicha combinación no se hallaría normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, las dos moléculas pueden derivar de especies diferentes y/o las dos moléculas pueden derivar de genes diferentes, por ejemplo, genes diferentes de la misma especie o los mismos genes de especies diferentes. Un promotor es en consecuencia heterólogo con respecto a una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente si dicha combinación no se halla normalmente en la naturaleza, es decir, que la molécula de polinucleótido transcribible no está naturalmente unida operativamente en combinación con la molécula promotora.

La molécula de polinucleótido transcribible generalmente puede ser cualquier molécula de ADN en la que se desea un aumento de transcripción de ARN. Dicha expresión de un transcripto de ARN puede producir una traducción de la molécula de ARNm resultante y de este modo la expresión de proteínas. Alternativamente, se puede diseñar una molécula de polinucleótido transcribible para finalmente disminuir la expresión de un gen o proteína específica. En una forma de realización, esto se obtiene por el uso de una molécula de polinucleótido transcribible que se orienta en dirección antisentido. Los expertos en la técnica están familiarizados con dicha tecnología antisentido. En breves palabras, a medida que la molécula de polinucleótido transcribible antisentido se transcribe, el producto de ARN se hibrida y secuestra una molécula de ARN complementaria dentro de la célula. Esta molécula de ARN duplex no se puede traducir en una proteína con la maquinaria de traducción celular y se degrada en la célula. Cualquier gen se puede regular negativamente de esta manera.

En consecuencia, una forma de realización de la invención es un elemento regulatorio de la presente invención, tal como los provistos en las SEQ ID NOs: 1–158 y 180–183, unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible de modo de modular la transcripción de la molécula de polinucleótido transcribible a un nivel deseado o en un patrón deseado después de la introducción de dicho constructo en una célula vegetal. En una forma de realización, la molécula de polinucleótido transcribible comprende una región codificadora de la proteína de un gen, y el promotor afecta la transcripción de una molécula de ARN que se traduce y expresa como un producto de proteína. En otra forma de realización, la molécula de polinucleótido transcribible comprende una región antisentido de un gen, y el promotor afecta la transcripción de una molécula de ARN antisentido, ARN de cadena doble u otra molécula de ARN inhibidora sinilar a fin de inhibir la expresión de una molécula de ARN de interés en una célula huésped blanco.

Genes de interés agronómico

Las moléculas de polinucleótidos transcribibles pueden ser genes de interés agronómico. Tal como se usa en la presente, el término "gen de interés agronómico" se refiere a una molécula de polinucleótido transcribible que cuando se expresa en un tejido, célula o tipo celular vegetal particular proporciona una característica deseable asociada con la morfología, fisiología, crecimiento y desarrollo, rendimiento, producto , perfil nutricional, resistencia a enfermedades o plagas, y/o tolerancia ambiental o química de las plantas. Los genes de interés agronómicos incluyen pero sin limitación a las que codifican una proteína de rendimiento, una proteína de resistencia al estrés, una proteína

de control del desarrollo, una proteína de diferenciación del tejido, una proteína del meristemo, una proteína de de respuesta ambiental, una proteína de senescencia, una proteína que responde a hormonas, una proteína de abscisión, una proteína fuente, una proteína de reserva, una proteína de control de la flor, una proteína de semilla, una proteína de resistencia a herbicidas, una proteína de resistencia a enfermedades, una enzima de biosíntesis de ácidos grasos, una enzima de biosíntesis de tocoferol, una enzima de biosíntesis de aminoácidos o una proteína insecticida o cualquier otro agente tal como una molécula antisentido o ARNi que se dirige a un gen particular para la supresión. El producto de un gen de interés agronómico puede actuar dentro de la planta a fin de causar un efecto sobre la fisiología o metabolismo vegetal o puede actuar como un agente plaguicida en la dieta de una plaga que se alimenta con la planta.

En una forma de realización de la invención, un promotor de la presente invención se incorpora en un constructo de modo que el promotor esté unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible que es un gen de interés agronómico. La expresión del gen de interés agronómico es deseable para conferir un rasgo beneficioso desde el punto de vista agronómico. Un rasgo agronómico beneficioso puede ser, por ejemplo, pero sin limitación, tolerancia a herbicidas, control de insectos, rendimiento modificado, resistencia a enfermedad fúngica, resistencia a virus, resistencia a nematodos, resistencia a enfermedad bacteriana, crecimiento y desarrollo de plantas, producción de almidón, producción de aceites modificados, alta producción de aceites, contenido de ácidos grasos modificado, alta producción de proteína, maduración de frutas, nutrición animal y/o humana mejorada, biopolímeros,

resistencia al estrés ambiental, péptidos farmacéuticos y péptidos secretables, rasgos de procesamiento mejorados, digestibilidad mejorada, producción de enzimas, sabor, fijación de nitrógeno, producción de semilla híbrido, producción de fibra y producción de biocombustible. Los genes de interés agronómico conocidos en el arte incluyen los resistencia a herbicidas (Patente U.S. N.º 6.803.501; 6.448.476; 6.248.876; 6.225.114; 6.107.549; 5.866.775; 5.804.425; 5.633.435; y 5.463.175), rendimiento aumentado (Patente U.S. N.º USRE38.446; 6.716.474; 6.663.906; 6.476.295; 6.441.277; 6.423.828; 6.399.330; 6.372.211; 6.235.971; 6.222.098; y 5.716.837), control de insectos (Patente U.S. N.º 6.809.078; 6.713.063; 6.686.452; 6.657.046; 6.645.497; 6.642.030; 6.639.054; 6.620.988; 6.593.293; 6.555.655; 6.538.109; 6.537.756; 6.521.442; 6.501.009; 6.468.523; 6.326.351; 6.313.378; 6.284.949; 6.281.016; 6.248.536; 6.242.241; 6.221.649; 6.177.615; 6.156.573; 6.153.814; 6.110.464; 6.093.695; 6.063.756; 6.063.597; 6.023.013; 5.959.091; 5.942.664; 5.942.658, 5.880.275; 5.763.245; y 5.763.241), resistencia a enfermedad fúngica (Patente U.S. N.º 6.653.280; 6.573.361; 6.506.962; 6.316.407; 6.215.048; 5.516.671; 5.773.696; 6.121.436; 6.316.407; y 6.506.962), resistencia a virus (Patentes U.S. Nros. 6.617.496; 6.608.241; 6.015.940; 6.013.864; 5.850.023; y 5.304.730), resistencia a nematodos (Patente U.S. N.º 6.228.992), resistencia a enfermedad bacteriana (Patente U.S. N.º 5.516.671), desarrollo y crecimiento vegetal (Patentes U.S. Nros. 6.723.897 y 6.518.488), producción de almidón (Patentes U.S. Nros. 6.538.181; 6.538.179; 6.538.178; 5.750.876; 6.476.295), producción de aceites modificados (Patentes U.S. Nros. 6.444.876; 6.426.447; y 6.380.462), producción de aceites alta (Patentes U.S. Nros. 6.495.739; 5.608.149; 6.483.008; y 6.476.295), contenido de ácidos grasos modificado

(Patente estadounidense Nos. 6.828.475; 6.822.141; 6.770.465; 6.706.950; 6.660.849; 6.596.538; 6.589.767; 6.537.750; 6.489.461; y 6.459.018), producción de proteína alta (Patente U.S. N.º 6.380.466), maduración de frutas (Patente U.S. N.º 5.512.466), nutrición animal y humana mejorada (Patente estadounidense Nos. 6.723.837; 6.653.530; 6.5412.59; 5.985.605; y 6.171.640), biopolímeros (Patente estadounidense Nos. USRE37.543; 6.228.623; y 5.958.745, y 6.946.588), resistencia a estrés ambiental (Patente U.S. N.º 6.072.103), péptidos farmacéuticos y péptidos secretables (Patente estadounidense Nos. 6.812.379; 6.774.283; 6.140.075; y 6.080.560), rasgos de procesamiento mejorados (Patente U.S. N.º 6.476.295), digestibilidad mejorada (Patente U.S. N.º 6.531.648) rafinosa baja (Patente U.S. N.º 6.166.292), producción industrial de enzimas (Patente U.S. N.º 5.543.576), sabor mejorado (Patente U.S. N.º 6.011.199), fijación de nitrógeno (Patente U.S. N.º 5.229.114), producción de semillas híbridas (Patente U.S. N.º 5.689.041), producción de fibra (Patente estadounidense Nos. 6.576.818; 6.271.443; 5.981.834; y 5.869.720) y producción de biocombustible (Patente U.S. N.º 5.998.700).

Alternativamente, un gen de interés agronómico puede afectar la característica o fenotipo vegetales anteriormente mencionados por la codificación de una molécula de ARN que causa la modulación específica de la expresión génica de un gen endógeno, por ejemplo por medio de antisentido (Ver, por ejemplo Patente U.S 5.107.065); ARN inhibidor ("ARNi", que incluye la modulación de la expresión génica por medio de ARNmi, ARNsi, ARNsi de acción trans y mecanismos mediados por ARNsi, por ejemplo, como se describe en las solicitudes publicadas US 2006/0200878 y US 2008/0066206, y

en la solicitud de patente estadounidense 11/974.469); o mecanismos mediados por cosupresión. El ARN también podría ser una molécula de ARN catalítica (por ejemplo, una ribozima o a riboswitch; ver *por ejemplo*, US 2006/0200878) manipulada genéticamente para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. En consecuencia, cualquier molécula de polinucleótido transcribible que codifica una molécula de ARN transcripta que afecta un cambio de fenotipo o morfología agronómicamente importante de interés puede ser útil para la práctica de la presente invención. Se conocen en la técnica los métodos para construir e introducir constructos en una célula de manera tal que la molécula de polinucleótido transcribible se transcriba en una molécula que es capaz de producir la supresión el gen. Por ejemplo, la supresión del gen pos–transcripción usando un constructo con una molécula de polinucleótido transcribible orientada antisentido para regular la expresión génica en las células vegetales se describe en las Patentes U.S. Nros 5.107.065 y U.S 5.759.829; la supresión del gen pos–transcripción usando un constructo con una molécula de polinucleótido transcribible orientada en sentido para regular la expresión génica en las células vegetales se describe en las Patentes estadounidense Nros 5.283.184 y N.º 5.231.020. La expresión de un polinucleótido transcribible en una célula vegetal también se puede usar para suprimir la incorporación de las plagas de planta en la célula vegetal, por ejemplo, composiciones aisladas de plagas de coleópteros (Publicación de patente U.S. N.º US2007/0124836) y composiciones aisladas de plagas de nematodos (Publicación de patente U.S. N.º US2007/0250947). Las plagas de plantas incluyen, pero sin limitación plagas artrópodos, plagas nematodos y plagas fúngicas o microbianas. Los ejemplos de de moléculas de

000051

polinucleótidos transcribibles para la incorporación en constructos de la presente invención incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN o genes de una especie diferente de las especies blanco o genes que se origina con estos o están presentes en la misma especie, pero se incorporan en células receptoras por métodos de ingeniería genética más que por técnicas de reproducción clásica o mejoramiento genético. El tipo de molécula de polinucleótido puede incluir, pero sin limitación, una molécula de polinucleótido que ya está presente en la célula vegetal, una molécula de polinucleótido de otra planta, una molécula de polinucleótido de un organismo diferente, o una molécula de polinucleótido generada en forma externa, tal como una molécula de polinucleótido que contiene un mensaje antisentido de un gen, o una molécula de polinucleótido que codifica una versión artificial, sintética, o modificada de otro modo de un transgén.

Marcadores seleccionables

Tal como se usa en la presente el término "marcador" se refiere a cualquier molécula de polinucleótido transcribible cuya expresión, o su carencia, se puede analizar o clasificar de alguna manera. Los genes marcadores para uso en la práctica de la presente invención incluyen, pero sin limitación moléculas de polinucleótido transcribibles que codifican β–glucuronidasa (GUS descripto en la Patente U.S N.º 5.599.670, proteína fluorescente verde y sus variantes (GFP se describe en las Patentes U.S Nros. 5.491.084 y 6.146.826), proteínas que confieren resistencia a antibióticos, o proteínas que confieren tolerancia a herbicidas. Los marcadores de resistencia a antibióticos útiles, que incluyen los que codifican proteínas que confieren resistencia a kanamicina (nptII), higromicina B (aph IV), estreptomicina o

espectinomicina (aad, spec/strep) y gentamicina (aac3 y aacC4) son conocidos en la técnica. Los herbicidas para los que se ha demostrado la tolerancia de la planta transgénica y que se puede aplicar el método de la presente invención, incluyen pero sin limitación: ácido amino–metil–fosfínico, glifosato, glufosinato, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinilo, dalapon, dicamba, ciclohexanodiona, inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa, y herbicidas isoxaflutol. Las moléculas de polinucleótidos transcribibles que codifican proteínas involucradas en la tolerancia a herbicidas son conocidas en la técnica, e incluyen, pero sin limitación una molécula de polinucleótido transcribible que codifica una 5–enolpiruvilshikimato–3–fosfato sintasa (EPSPS descripto en las Patentes U.S. Nros. 5.627.061; 5.633.435; 6.040.497; y 5.094.945); una molécula de polinucleótido transcribible que codifica una glifosato oxidorreductasa y una glifosato–N–acetil transferasa (GOX descripto en la Patente U.S. N.º 5.463.175; GAT descripta en la publicación de patente U.S. N.º 20030083480, y dicamba monooxigensa publicación de patente U.S. N.º 20030135879); una molécula de polinucleótido transcribible que codifica bromoxinilo nitrilasa *(Bxn* descripto para tolerancia a bromoxinilo en la Patente U.S. N.º 4.810.648); una molécula de polinucleótido transcribible que codifica fitoeno desaturasa *(crtI)* descripta en Misawa, *et al.*, *Plant Journal*, 4:833–840 (1993) y Misawa, *et al.*, *Plant Journal*, 6:481–489 (1994) para tolerancia a norflurazona; una molécula de polinucleótido que codifica acetohidroácido sintasa (AHAS, *aka* ALS) descripto para tolerancia a norflurazona; una molécula de polinucleótido transcribible que codifica acetohidroácido sintasa (AHAS, *aka* ALS) descripto en Sathasiivan, *et al., Nucl. Acids Res.*, 18:2188–2193 (1990) 2193 para la tolerancia a herbicidas de sulfonilurea; y el gen *bar*

descripto en DeBlock, *et al., EMBO Journal*, 6:2513–2519 (1987) para la tolerancia a glufosinato y bialafós. Las moléculas de promotor de la presente invención pueden expresar las moléculas de polinucleótido transcribibles ligadas que codifican para fosfinotricina acetiltransferasa, EPSPS resistente a glifosato, aminoglocósido fosfotransferasa, hidroxifenil piruvato deshidrogenasa, higromicina fosfotransferasa, neomicina fosfotransferasa, dalapon deshalogenasa, nitrilasa resistente a bromoxinilo, antranilato sintasa,, ariloxialcanoato dioxigenasas, acetil CoA carboxilasa, glifosato oxidorreductasa y glifosato–Nacetil transferasa.

También se incluye en el término "marcadores seleccionables" los genes que codifican un marcador seleccionable cuya secreción se puede detectar como medio identificar o seleccionar células transformadas. Los ejemplos incluyen marcadores que codifican un antígeno secretable que se puede identificar por interacción de anticuerpo, o incluso de enzimas secretables que se pueden detectar catalíticamente. Las proteínas del marcador seleccionable secretado se incluyen en numerosas clases, que incluyen proteínas pequeñas difusibles que son detectables *(por ejemplo,* por ELISA), enzimas activas pequeñas que se pueden detectar en la solución extracelular solución *(por ejemplo,* a–amilasa, 13–lactamasa, fosfinotricina transferasa), o proteínas que se insertan o inmovilizan en la pared celular (tal como las proteínas que incluyen una secuencia líder tal como la que se halla en la unidad de extensión de expresión o proteínas relacionadas con la patogénesis del tabaco también conocidas como PR–S). Otros posibles genes del marcador seleccionable serán evidentes para los expertos en la técnica y están comprendidos por la presente invención..

Transformación celular

La invención también se refiere a un método para producir células y plantas transformadas que comprenden un promotor unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible.

El término "transformación" se refiere a la introducción de ácidos nucleicos en un recipiente huésped. Como se usa en la presente el término "huésped" se refiere a células de bacterias, hongos o plantas, que incluye cualquier célula, tejido, órgano o progenir de las bacterias, hongos o plantas. Los tejidos y células de plantas incluyen protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, plántulas, embriones y polen.

Tal como se usa en la presente, el término "transformado" se refiere a célula, tejido, órgano u organismo en el que se introducido una molécula de polinucleótido extraña, tal como un constructo. La molécula de polinucleótido introducida se puede integrar en el ADN genómico de la célula, tejido, órgano u organismo receptor de modo que la molécula de polinucleótido introducida sea heredada por la progenie posterior. Una célula u organismo "transgénico" o "transformado" también incluye la progenie de una célula u organismo y la progenie producida a partir de un programa de mejoramiento genético que emplea dicha planta transgénica como progenitor en una cruza y que exhibe un fenotipo alterado resultante de la presencia de una molécula de polinucleótido extraña. El término "transgénico" se refiere a un a bacteria, hongo o planta que contiene una o más moléculas de ácido polinucleico heterólogas.

Existen muchos métodos para introducir moléculas de ácidos nucleicos en células vegetales. El método generalmente comprende las etapas de

seleccionar una célula huésped adecuada, transformar la célula huésped con un vector recombinante y obtener la célula huésped transformada. Los métodos adecuados incluyen infección bacteriana *(por ejemplo, Agrobacterium),* vectores de cromosoma artificial bacteriano binario, administración directa de ADN *(por ejemplo,* por medio de transformación mediada por PEG, captación de ADN mediada por desecación/inhibición, electroporación, agitación con fibras de carburo de silicio y aceleración de partículas de ADN recubiertas, *etc.* (revisado en Potrykus, *et al., Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42: 205, 1991).

La tecnología para la introducción de ADN en las células es bien conocida en la técnica. Los métodos y materiales para transformar células vegetales por introducir un constructo de polinucleótidos de planta en un genoma de planta en la práctica de esta invención pueden incluir cualquiera de los métodos bien conocidos y demostrados. Se puede utilizar cualquiera de los métodos descriptos para transformar una célula huésped con uno o más promotores y/o constructos de la presente invención. Las células huésped pueden ser cualquier organismo tal como una célula de planta, célula de alga, algas, célula fúngica, hongos, célula bacteriana o célula de insecto. Las células huésped y transformadas preferidas incluyen células de: plantas, *Aspergillus,* levaduras, insectos, bacterias y algas.

Las plantas transgénicas regeneradas se pueden autopolinizar para proporcionar plantas transgénicas homócigas. Alternativamente, el polen obtenido de las plantas transgénicas regeneradas se pueden cruzar con las plantas no transgénicas, con preferencia líneas endogámicas de especies agronómicamente importantes. Las descripciones de los métodos de

mejoramiento genético que se usan comúnmente para diferentes rasgos y cultivos se pueden hallar en alguno de varios libros de referencia, ver, por ejemplo, Allard, *Principles of Plant Breeding*, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50–98 (1960); Simmonds, *Principles of crop improvement*, Longman, Inc., NY, 369–399 (1979); Sneep y Hendriksen, Plant breeding perspectives, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, *Soybeans: Improvement, Productiosn and Uses*, 2nd Edición, Monograph, 16:249 (1987); Fehr, *Principles of variety development*, *Theory and Technique,* (Vol. 1) y *Crop Species Soybean* (Vol 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360–376 (1987). A la inversa, se puede usar plantas no transgénicas para polinizar las plantas transgénicas regeneradas.

Las plantas transformadas se pueden analizar para determinar la presencia de los genes de interés y el nivel y/o perfil de expresión conferido por los elementos regulatorios de la presente invención. Los expertos en la técnica conocen numerosos métodos disponibles para el análisis de las plantas transformadas. Por ejemplo, los métodos de análisis de plantas incluyen, pero sin limitación transferencias Southern o transferencias northern, métodos basado en PCR, análisis bioquímicos, métodos de detección fenotípica, evaluaciones de campo y ensayos inmunodiagnósticos. La expresión de una molécula de polinucleótido transcribible se puede medir usando reactivos y métodos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) descriptos por el fabricante y los tiempos del ciclo de PCR se determinan usando la matriz de prueba TaqMan®. En forma alternativa, los reactivos y métodos Invader®

(Third Wave Technologies, Madison, WI) descriptos por el fabricante se pueden usar para la expresión del transgén.

Las semillas de las plantas de esta invención se pueden recolectar a partir de plantas transgénicas fértiles y se usan para cultivar generaciones de progenie de las plantas transformadas de esta invención que incluyen líneas de planta híbridas que comprende el constructo de esta invención y que expresan un gen de interés agronómico.

La presente invención también proporciona partes de plantas de la presente invención. Las partes de plantas, sin limitación, incluyen hojas, tallos, raíces, tubérculos, semilla, endospermo, óvulo y polen. La invención también incluye y proporciona células de planta transformada que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente invención.

La planta transgénica puede pasar la molécula de polinucleótido transgénica a su progenie. La progenie incluye cualquier parte de planta regenerable o semilla que comprende el transgén derivado de una planta ancestral. La planta transgénica con preferencia es homóciga para la molécula de polinucleótido transformada y transmite esta secuencia al total de sus descendencia como resultado de la reproducción sexual. La progenie se puede cultivar a partir de semillas producidas por la planta transgénica. Estas plantas adicionales luego se pueden autopolinizar para generar una línea verdadera de mejoramiento genético de plantas. Se evalúa la progenie de estas plantas, entre otras cosas por la expresión génica. La expresión génica se puede detectar por varios métodos comunes tales como transferencia western, transferencia northern, immunoprecipitación y ELISA.

Productos de consumo básicos

La presente invención proporciona un producto básico que comprende moléculas de ADN de acuerdo con la invención. Como se usa en la presente, un "producto básico" se refiere a cualquier composición o producto que está compuesto de un material derivado de una planta, semilla, célula de planta o parte de planta que comprende una molécula de ADN de la invención. Los productos de consumo básicos se pueden comercializar o a consumidores o pueden ser viables o no viables. Los productos de consumo básicos no viables incluyen pero sin limitación semillas y granos no viables; semillas, parte de semillas y partes plantas procesadas; tejido de planta deshidratado, tejido de planta congelado, y tejido de planta procesado; semillas y partes de planta procesadas par alimentación animal para el consumo de de animales terrestres y/o acuáticos, aceite, sémola, harina, copos, salvado, fibra, leche, queso, papel, crema, vino, y cualquier otro alimento para el consumo humano; y productos de biomasa y combustible. Los productos de consumo básicos viables incluye pero sin limitación semillas y células de plantas. Las plantas que comprenden una molécula de ADN de acuerdo con la invención en consecuencia se pueden usar para la fabricación de cualquier producto de consumo básico normalmente obtenido de las plantas o partes de estas.

Habiendo descripto la en general la invención, la misma se comprenderá más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración, y no están destinados a limitar la presente invención, a menos se que especifique. Los expertos en la técnica deberán apreciar que las técnicas descriptas en los ejemplos siguientes representan

técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención. Sin embargo, los expertos en la técnica, deberán a la luz de la presente descripción, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las formas de realización específica descriptas y aún obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención, en consecuencia toda materia expuesta o mostrada en los dibujos acompañantes se debe interpretar como ilustrativa y no en un sentido limitado.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación y clonación de elementos regulatorios

Se identificaron nuevas secuencias de elementos regulatorios de la transcripción de ubiquitina, o del grupo de expresión del elemento regulatorio de tanscripción (EXP) y aislaron del ADN genómico de las especies monocotiledóneas tallo azul gigante (*Andropogon gerardii*), carricera (*Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*)), cola de zorro (*Setaria viridis*), Teosinte (*Zea mays subsp. mexicana*), mijo de cola de zorro (*Setaria italica*), y lágrimas de Job (*Coix lacryma–jobi*).

Se identificaron las secuencias del transcripto de Ubiquitina 1 de cada una de las especies anteriores. La región no traducida 5´ (5´ UTR) de cada uno de los transcriptos de Ubiquitina 1 se usó para diseñar cebadores para amplificar los correspondientes elementos regulatorios de transcripción para el gen de ubiquitina identificado, que comprende un promotor, líder (5´ UTR) y primer intrón unido operativamente. Los cebadores se usaron con bibliotecas GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) construidas siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 5´ de la

correspondiente secuencia de ADN genómica. Los elementos regulatorios de la transcripción de ubiquitina también se aislaron de la monocotiledónea de *Sorghum bicolor* usando secuencias públicas que son homólogos a los genes de Ubiquitina 4, 6 y 7 de *Zea mays*.

Usando las secuencias identificadas, se realizó un análisis bioinformática para identificar elementos regulatorios dentro del ADN amplificado. Usando los resultados de este análisis, los elementos regulatorios se definieron dentro de las secuencias de ADN y los cebadores se diseñaron para amplificar los elementos regulatorios. La correspondiente molécula de ADN para cada elemento regulatorio se amplificó usando condiciones de reacción de la cadena de polimerasa estándares con cebadores que contienen sitios únicos de la enzima de restricción y ADN genómico aislado de*A. gerardii*, *S. ravennae*, *S. viridis*, *Z. mays subsp. mexicana*, *S. italica*, *C. lacryma–jobi*, y *S. bicolor*. Los fragmentos de ADN resultantes se ligaron en los vectores de expresión de planta básicos y se secuenciaron. Luego se realizó un análisis del elemento regulatorio TSS y las uniones de empalme intrón/exón usando los protoplastos de planta transformados. En breves palabras, los protoplastos se transformaron con los vectores de expresión de planta que comprenden fragmentos de ADN clonados unidos operativamente a una molécula de polinucléotido transcribible heteróloga y el sistema 5′ RACE para la amplificación rápida de los extremos de ADNc, Versión 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, California 92008) se usó para confirmar el elemento regulatorio TSS y uniones de empalme intrón/exón por el análisis de la secuencia de los transcriptos de ARNm producidos de este modo.

Las secuencias de los grupos de elementos de expresión de regulación de la transcripción identificados ("EXP") se proveen en la presente como SEQ

ID NOS: 1, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 25, 27, 29, 31, 33, 37, 39, 41, 45, 49, 53, 55, 59, 63, 65, 69, 73, 75, 77, 79, 83, 85, 87, 90, 93, 95, 97, 98, 99, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 124, 125, 126, 128, 130, 132, 133, 134, 136, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 180, 181 y 183, tal como se enumeran en la Tabla 1 siguiente. Las secuencias promotoras se proporcionan en la presente como SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 y 135. Las secuencias líder se proporcionan en la presente como SEQ ID NOS: 3, 20, 35, 43, 47, 51, 57, 61, 67, 71 y 81. Las secuencias de intrón se proporcionan en la presente como SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 182. Se proporciona una secuencia mejoradora como SEQ ID NO: 89.

Tabla 1. Grupos de elementos de expresión de regulación de la transcripción ("EXP"), promotores, mejoradores, líderes e intrones aislados de diversas especies de pastos

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
EXP–ANDge.Ubq1:1:9	1	3741	*A. gerardii*	EXP: P–ANDge.Ubq1–1:1:11 (SEQ ID NO:2); L–ANDge.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:3); I–ANDge.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO:4).	
P–ANDge.Ubq1–1:1:11	2	2603	*A. gerardii*	promotor	
L–ANDge.Ubq1–1:1:2	3	99	*A. gerardii*	líder	
I–ANDge.Ubq1–1:1:3	4	1039	*A. gerardii*	intrón	

600092

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	3255	*A. gerardii*	EXP: P–ANDge.Ubq1–1:1:9 (SEQ ID NO:6); L–ANDge.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:3); I–ANDge.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO:7).	pMON136264, PCR0145892, pMON140896, PCR41
P–ANDge.Ubq1–1:1:9	6	2114	*A. gerardii*	promotor	
I–ANDge.Ubq1–1:1:4	7	1042	*A. gerardii*	intrón	
EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	2785	*A. gerardii*	EXP: P–ANDge.Ubq1–1:1:10 (SEQ ID NO:9); L–ANDge.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:3); I–ANDge.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO:7).	pMON140917, PCR42

000063

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
P–ANDge.Ubq1–1:1:10	9	1644	*A. gerardii*	promotor	
EXP–ANDge.Ubq1:1:10	10	2613	*A. gerardii*	EXP: P–ANDge.Ubq1–1:1:12 (SEQ ID NO:11); L–ANDge.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:3); I–ANDge.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO:7).	PCR0145815, PCR43
P–ANDge.Ubq1–1:1:12	11	1472	*A. gerardii*	promotor	
EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	2255	*A. gerardii*	EXP: P–ANDge.Ubq1–1:1:8 (SEQ ID NO:13); L–ANDge.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:3); I–	pMON136259, PCR0145893,

000084

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				ANDge.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO:7).	pMON140898, PCR44
P–ANDge.Ubq1–1:1:8	13	1114	*A. gerardii*	promotor	
EXP–ANDge.Ubq1:1:11	14	1912	*A. gerardii*	EXP: P–ANDge.Ubq1–1:1:13 (SEQ ID NO:15); L–ANDge.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:3); I–ANDge.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO:7).	PCR0145817, pMON140899, PCR45
P–ANDge.Ubq1–1:1:13	15	771	*A. gerardii*	promotor	
EXP–	16	1623	*A. gerardii*	EXP: P–ANDge.Ubq1–1:1:14 (SEQ ID	PCR0145819,

600035

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
ANDge.Ubq1:1:12				NO:17); L–ANDge.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:3); I–ANDge.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO:7).	pMON140900, PCR46
P–ANDge.Ubq1–1:1:14	17	482	*A. gerardii*	promotor	
EXP–ERIra.Ubq1	18	3483	*E. ravennae*	EXP: P–ERIra.Ubq1–1:1:10 (SEQ ID NO:19); L–ERIra.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:20); I–ERIra.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:21).	
P–ERIra.Ubq1–1:1:10	19	2536	*E. ravennae*	promotor	
L–ERIra.Ubq1–1:1:2	20	94	*E. ravennae*	líder	

000096

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
I–ERIra.Ubq1–1:1:1	21	1041	*E. ravennae*	intrón	
EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	3152	*E. ravennae*	EXP: P–ERIra.Ubq1–1:1:9 (SEQ ID NO:23); L–ERIra.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:20); I–ERIra.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:24).	pMON136263, PCR0145896, pMON140904, PCR50
P–ERIra.Ubq1–1:1:9	23	2014	*E. ravennae*	promotor	
I–ERIra.Ubq1–1:1:2	24	1044	*E. ravennae*	intrón	
EXP–ERIra.Ubq1:1:10	25	2663	*E. ravennae*	EXP: P–ERIra.Ubq1–1:1:11 (SEQ ID NO:26); L–ERIra.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:20); I–	PCR0145820, pMON140905,

000067

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				ERIra.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:24).	PCR51
P–ERIra.Ubq1–1:1:11	26	1525	*E. ravennae*	promotor	
EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	2182	*E. ravennae*	EXP: P–ERIra.Ubq1–1:1:8 (SEQ ID NO:28); L–ERIra.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:20); I–ERIra.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:24).	pMON136258, PCR0145897, pMON140906, PCR52, pMON142864, pMON142862
P–ERIra.Ubq1–1:1:8	28	1044	*E. ravennae*	promotor	

000088

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
EXP–ERIra.Ubq1:1:11	29	1934	*E. ravennae*	EXP: P–ERIra.Ubq1–1:1:12 (SEQ ID NO:30); L–ERIra.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:20); I–ERIra.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:24).	PCR0145821, pMON140907, PCR53
P–ERIra.Ubq1–1:1:12	30	796	*E. ravennae*	promotor	
EXP–ERIra.Ubq1:1:12	31	1649	*E. ravennae*	EXP: P–ERIra.Ubq1–1:1:13 (SEQ ID NO:32); L–ERIra.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:20); I–ERIra.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:24).	PCR0145822, pMON140908, PCR54
P–ERIra.Ubq1–1:1:13	32	511	*E. ravennae*	promotor	
EXP–Sv.Ubq1:1:2	33	2631	*S. viridis*	EXP: P–Sv.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:34); L–	pMON140878,

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:35); I–Sv.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:36).	PCR0145909, pMON129203, pMON131958
P–Sv.Ubq1–1:1:1	34	1493	*S. viridis*	promotor	
L–Sv.Ubq1–1:1:2	35	127	*S. viridis*	líder	
I–Sv.Ubq1–1:1:1	36	1011	*S. viridis*	intrón	
EXP–Sv.Ubq1:1:3	37	2173	*S. viridis*	EXP: P–Sv.Ubq1–1:1:2 (SQ ID NO:38); L–Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:35); I–Sv.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:36).	PCR0145929, pMON129204

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
P–Sv.Ubq1–1:1:2	38	1035	*S. viridis*	promotor	
EXP–Sv.Ubq1:1:5	39	1819	*S. viridis*	EXP: P–Sv.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO:40); L–Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:35); I–Sv.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:36).	pMON129205, pMON131959
P–Sv.Ubq1–1:1:3	40	681	*S. viridis*	promotor	
EXP–Zm.UbqM1:1:1 (Allele–1)	41	1922	*Z. mais* subsp. *mexicana*	EXP: P–Zm.UbqM1–1:1:1 (SEQ ID NO:42); L–Zm.UbqM1–1:1:1 (SEQ ID NO:43); I–Zm.UbqM1–1:1:5 (SEQ ID NO:44).	pMON140881, PCR0145914, pMON129210, pMON131961

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
P–Zm.UbqM1–1:1:1 (Allele–1)	42	850	*Z. mais* subsp. *mexicana*	promotor	
L–Zm.UbqM1–1:1:1 (Allele–1)	43	78	*Z. mais* subsp. *mexicana*	líder	
I–Zm.UbqM1–1:1:5 (Allele–1)	44	994	*Z. mais* subsp. *mexicana*	intrón	
EXP–Zm.UbqM1:1:4 (Allele–2)	45	1971	*Z. mais* subsp. *mexicana*	EXP: P–Zm.UbqM1–1:1:4 (SEQ ID NO:46); L–Zm.UbqM1–1:1:5 (SEQ ID NO:47); I–Zm.UbqM1–1:1:4 (SEQ ID NO:48).	pMON140882, PCR0145915, pMON129212,

000072

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
					pMON131963
P–Zm.UbqM1–1:1:4 (Allele–2)	46	887	*Z. mais* subsp. *mexicana*	promotor	
L–Zm.UbqM1–1:1:5 (Allele–2)	47	77	*Z. mais* subsp. *mexicana*	líder	
I–Zm.UbqM1–1:1:4 (Allele–2)	48	1007	*Z. mais* subsp. *mexicana*	intrón	
EXP–Zm.UbqM1:1:2 (Allele–3)	49	2005	*Z. mais* subsp. *mexicana*	EXP: P–Zm.UbqM1–1:1:5 (SEQ ID NO:50); L–Zm.UbqM1–1:1:4 (SEQ ID NO:51); I–	PCR0145916, pMON129211,

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				Zm.UbqM1–1:1:11 (SEQ ID NO:52).	pMON131962, pMON132047
P–Zm.UbqM1–1:1:5 (Allele–3)	50	877	*Z. mais* subsp. *mexicana*	promotor	
L–Zm.UbqM1–1:1:4 (Allele–3)	51	78	*Z. mais* subsp. *mexicana*	líder	
I–Zm.UbqM1–1:1:11 (Allele–3)	52	1050	*Z. mais* subsp. *mexicana*	intrón	
EXP–Zm.UbqM1:1:5	53	2005	*Z. mais* subsp.	EXP: P–Zm.UbqM1–1:1:5 (SEQ ID NO:50); L–	

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
(Allele–3)			*mexicana*	Zm.UbqM1–1:1:4 (SEQ ID NO:51); I–Zm.UbqM1–1:1:12 (SEQ ID NO:54).	
I–Zm.UbqM1–1:1:12 (Allele–3)	54	1050	*Z. mais* subsp. *mexicana*	intrón	
EXP–Sb.Ubq4:1:1	55	1632	*S. bicolor*	EXP: P–Sb.Ubq4–1:1:1 (SEQ ID NO:56); L–Sb.Ubq4–1:1:1 (SEQ ID NO:57); I–Sb.Ubq4–1:1:1 (SEQ ID NO:58).	pMON140886, PCR0145921, pMON129219, pMON132932
P–Sb.Ubq4–1:1:1	56	401	*S. bicolor*	promotor	

000075

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
L–Sb.Ubq4–1:1:1	57	154	*S. bicolor*	líder	
I–Sb.Ubq4–1:1:1	58	1077	*S. bicolor*	intrón	
EXP–Sb.Ubq6	59	2000	*S. bicolor*	EXP: P–Sb.Ubq6–1:1:2 (SEQ ID NO:60); L–Sb.Ubq6–1:1:1 (SEQ ID NO:61); I–Sb.Ubq6–1:1:1 (SEQ ID NO:62).	
P–Sb.Ubq6–1:1:2	60	791	*S. bicolor*	promotor	
L–Sb.Ubq6–1:1:1	61	136	*S. bicolor*	líder	
I–Sb.Ubq6–1:1:1	62	1073	*S. bicolor*	intrón	
EXP–Sb.Ubq6:1:1	63	2064	*S. bicolor*	EXP: P–Sb.Ubq6–1:1:1 (SEQ ID NO:64); L–	pMON140887,

600076

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				Sb.Ubq6–1:1:1 (SEQ ID NO:61); I–Sb.Ubq6–1:1:1 (SEQ ID NO:62).	PCR0145920, pMON129218
P–Sb.Ubq6–1:1:1	64	855	*S. bicolor*	promotor	
EXP–Sb.Ubq7:1:1	65	2000	*S. bicolor*	EXP: P–Sb.Ubq7–1:1:1 (SEQ ID NO:66); L–Sb.Ubq7–1:1:1 (SEQ ID NO:67); I–Sb.Ubq7–1:1:1 (SEQ ID NO:68).	pMON132974
P–Sb.Ubq7–1:1:1	66	565	*S. bicolor*	promotor	
L–Sb.Ubq7–1:1:1	67	77	*S. bicolor*	líder	
I–Sb.Ubq7–1:1:1	68	1358	*S. bicolor*	intrón	

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
EXP–SETit.Ubq1:1:1	69	2622	*S. italica*	EXP: P–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:70); L–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:71); I–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:72).	pMON140877, PCR0145900, pMON129200
P–SETit.Ubq1–1:1:1	70	1492	*S. italica*	promotor	
L–SETit.Ubq1–1:1:1	71	127	*S. italica*	líder	
I–SETit.Ubq1–1:1:1	72	1003	*S. italica*	intrón	
EXP–SETit.Ubq1:1:4	73	2622	*S. italica*	EXP: P–SETit.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO:74); L–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:71); I–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:72).	pMON132037

CU00178

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
P–SETit.Ubq1–1:1:4	74	1492	*S. italica*	promotor	
EXP–SETit.Ubq1:1:2	75	2164	*S. italica*	EXP: P–SETit.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO:76); L–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:71); I–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:72).	
P–SETit.Ubq1–1:1:2	76	1034	*S. italica*	promotor	
EXP–SETit.Ubq1:1:3	77	1810	*S. italica*	EXP: P–SETit.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO:78); L–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:71); I–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:72).	PCR0145905, pMON129202, pMON131957
P–SETit.Ubq1–1:1:3	78	680	*S. italica*	promotor	

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
EXP–Cl.Ubq1:1:1	79	1940	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:80); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:82).	pMON140889, PCR0145922, pMON140913, PCR19, pMON129221, pMON146795, pMON146796, pMON146797, pMON146798,

000080

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
					pMON146799, pMON132047, pMON146800, pMON146801, pMON146802
P–Cl.Ubq1–1:1:1	80	837	*C. lacrima–jobi*	promotor	
L–Cl.Ubq1–1:1:1	81	86	*C. lacrima–jobi*	líder	
I–Cl.Ubq1–1:1:1	82	1017	*C. lacrima–jobi*	intrón	
EXP–Cl.Ubq1:1:3	83	1845	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO:84); L–	PCR0145945,

G00081

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:82).	pMON140914, PCR20
P–Cl.Ubq1–1:1:4	84	742	*C. lacrima–jobi*	promotor	
EXP–Cl.Ubq1:1:4	85	1504	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO:86); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:82).	PCR0145946, pMON140915, PCR21
P–Cl.Ubq1–1:1:3	86	401	*C. lacrima–jobi*	promotor	
EXP–Cl.Ubq1:1:5	87	1157	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:5 (SEQ ID NO:88); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–	PCR0145947, pMON140916,

G.00822

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				1:1:1 (SEQ ID NO:82).	PCR22
P–Cl.Ubq1–1:1:5	88	54	*C. lacrima–jobi*	promotor	
E–Cl.Ubq1–1:1:1	89	798	*C. lacrima–jobi*	mejorador	
EXP–Cl.Ubq1:1:12	90	3393	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:9 (SEQ ID NO: 91); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:7 (SEQ ID NO: 92)	pMON142729
P–Cl.Ubq1–1:1:9	91	2287	*C. lacrima–jobi*	Promotor	
I–Cl.Ubq1–1:1:7	92	1020	*C. lacrima–jobi*	Intrón	
EXP–Cl.Ubq1:1:16	93	3393	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:9 (SEQ ID NO: 91); L–	pMON146750,

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:6 (SEQ ID NO: 94)	pMON142748
I–Cl.Ubq1–1:1:6	94	1020	*C. lacrima–jobi*	Intrón	
EXP–Cl.Ubq1:1:11	95	2166	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:10 (SEQ ID NO: 96); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:7 (SEQ ID NO: 92)	pMON142730
P–Cl.Ubq1–1:1:10	96	1060	*C. lacrima–jobi*	Promotor	
EXP–Cl.Ubq1:1:17	97	2166	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:10 (SEQ ID NO: 96); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–	pMON146751, pMON142749

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				1:1:6 (SEQ ID NO: 94)	
EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	1943	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:6 (SEQ ID NO: 94)	pMON140889, PCR0145922, pMON140913, PCR19, pMON129221
EXP–Cl.Ubq1:1:18	99	1943	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:7 (SEQ ID NO: 92)	pMON146795

CC00035

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
EXP–Cl.Ubq1:1:19	100	1943	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:8 (SEQ ID NO: 101)	pMON146796
I–Cl.Ubq1–1:1:8	101	1020	*C. lacrima–jobi*	Intrón	
EXP–Cl.Ubq1:1:20	102	1943	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:9 (SEQ ID NO: 103)	pMON146797
I–Cl.Ubq1–1:1:9	103	1020	*C. lacrima–jobi*	Intrón	
EXP–Cl.Ubq1:1:21	104	1943	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L–	pMON146798

CC00086

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:10 (SEQ ID NO: 105)	
I–Cl.Ubq1–1:1:10	105	1020	*C. lacrima–jobi*	Intrón	
EXP–Cl.Ubq1:1:22	106	1943	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:11 (SEQ ID NO: 107)	pMON146799
I–Cl.Ubq1–1:1:11	107	1020	*C. lacrima–jobi*	Intrón	
EXP–Cl.Ubq1:1:23	108	1943	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–	pMON132047, pMON146800

430084

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				1:1:12 (SEQ ID NO: 109)	
I–Cl.Ubq1–1:1:12	109	1020	*C. lacrima–jobi*	Intrón	
EXP–Cl.Ubq1:1:24	110	1943	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:13 (SEQ ID NO: 111)	pMON146801
I–Cl.Ubq1–1:1:13	111	1020	*C. lacrima–jobi*	Intrón	
EXP–Cl.Ubq1:1:25	112	1943	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 80); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:14 (SEQ ID NO: 113)	pMON146802

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
I–Cl.Ubq1–1:1:14	113	1020	*C. lacrima–jobi*	Intrón	
EXP–Cl.Ubq1:1:13	114	1848	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO: 84); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:6 (SEQ ID NO: 94)	PCR0145945, pMON140914, PCR20
EXP–Cl.Ubq1:1:14	115	1507	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 86); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–1:1:6 (SEQ ID NO: 94)	PCR0145946, pMON140915, PCR21
EXP–Cl.Ubq1:1:15	116	1160	*C. lacrima–jobi*	EXP: P–Cl.Ubq1–1:1:5 (SEQ ID NO: 88); L–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO:81); I–Cl.Ubq1–	PCR0145947, pMON140916,

620629

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				1:1:6 (SEQ ID NO: 94)	PCR22
EXP–SETit.Ubq1:1:5	117	2625	*S. italica*	EXP: P–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 70); L–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I–SETit.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 118)	pMON140877, PCR0145900, pMON129200
I–SETit.Ubq1–1:1:2	118	1006	*S. italica*	Intrón	
EXP–SETit.Ubq1:1:10	119	2625	*S. italica*	EXP: P–SETit.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO: 64); L–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I–SETit.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 120)	pMON132037
I–SETit.Ubq1–1:1:3	120	1006	*S. italica*	Intrón	

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
EXP–SETit.Ubq1:1:12	121	2625	*S. italica*	EXP: P–SETit.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO: 64); L–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I–SETit.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO: 122)	
I–SETit.Ubq1–1:1:4	122	1006	*S. italica*	Intrón	
EXP–SETit.Ubq1:1:7	123	2167	*S. italica*	EXP: P–SETit.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 71); L–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I–SETit.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 118)	PCR0145928, pMON129201
EXP–SETit.Ubq1:1:6	124	1813	*S. italica*	EXP: P–SETit.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 73); L–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I–	PCR0145905, pMON129202

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				SETit.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 118)	
EXP–SETit.Ubq1:1:11	125	1813	*S. italica*	EXP: P–SETit.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 73); L–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I–SETit.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 120)	pMON131957
EXP–SETit.Ubq1:1:13	126	1813	*S. italica*	EXP: P–SETit.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 73); L–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I–SETit.Ubq1–1:1:5 (SEQ ID NO: 127)	
I–SETit.Ubq1–1:1:5	127	1006	*S. italica*	Intrón	
EXP–Sv.Ubq1:1:7	128	2634	*S. viridis*	EXP: P–Sv.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 34); L–	pMON140878,

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 35); I–Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 129)	PCR0145909, pMON129203
I–Sv.Ubq1–1:1:2	129	1014	*S. viridis*	Intrón	
EXP–Sv.Ubq1:1:11	130	2634	*S. viridis*	EXP: P–Sv.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 34); L–Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 35); I–Sv.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 131)	pMON131958
I–Sv.Ubq1–1:1:3	131	1014	*S. viridis*	Intrón	
EXP–Sv.Ubq1:1:8	132	2176	*S. viridis*	EXP: P–Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 38); L–Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 35); I–Sv.Ubq1–	PCR0145929, pMON129204

600083

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				1:1:2 (SEQ ID NO: 129)	
EXP–Sv.Ubq1:1:9	133	1822	*S. viridis*	EXP: P–Sv.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 40); L–Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 35); I–Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 129)	pMON129205
EXP–Sv.Ubq1:1:10	134	1822	*S. viridis*	EXP: P–Sv.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO: 135); L–Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 35); I–Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 129)	PCR0145911
P–Sv.Ubq1–1:1:4	135	681	*S. viridis*	Promotor	
EXP–Sv.Ubq1:1:12	136	1822	*S. viridis*	EXP: P–Sv.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 40); L–	pMON131959

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 35); I–Sv.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 131)	
EXP–Zm.UbqM1:1:6 (Allele–1)	137	1925	*Z. mais subsp. Mexicana*	EXP: P–Zm.UbqM1–1:1:1 (SEQ ID NO: 42); L–Zm.UbqM1–1:1:1 (SEQ ID NO: 43); I–Zm.UbqM1–1:1:13 (SEQ ID NO: 138)	pMON140881, PCR0145914, pMON129210
I–Zm.UbqM1–1:1:13 (Allele–1)	138	997	*Z. mais subsp. Mexicana*	Intrón	
EXP–Zm.UbqM1:1:10 (Allele–1)	139	1925	*Z. mais subsp. Mexicana*	EXP: P–Zm.UbqM1–1:1:1 (SEQ ID NO: 42); L–Zm.UbqM1–1:1:1 (SEQ ID NO: 43); I–	pMON131961

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
				Zm.UbqM1–1:1:17 (SEQ ID NO: 140)	
I–Zm.UbqM1–1:1:17 (Allele–1)	140	997	*Z. mais subsp. Mexicana*	Intrón	
EXP–Zm.UbqM1:1:7 (Allele–2)	141	1974	*Z. mais subsp. Mexicana*	EXP: P–Zm.UbqM1–1:1:4 (SEQ ID NO: 46); L–Zm.UbqM1–1:1:5 (SEQ ID NO: 47); I–Zm.UbqM1–1:1:14 (SEQ ID NO: 142)	pMON140882, PCR0145915, pMON129212
I–Zm.UbqM1–1:1:14 (Allele–2)	142	1010	*Z. mais subsp. Mexicana*	Intrón	
EXP–Zm.UbqM1:1:12	143	1974	*Z. mais subsp.*	EXP: P–Zm.UbqM1–1:1:4 (SEQ ID NO: 46);	pMON131963

C00096

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
(Allele–2)			*Mexicana*	L–Zm.UbqM1–1:1:5 (SEQ ID NO: 47); I–Zm.UbqM1–1:1:19 (SEQ ID NO: 144)	
I–Zm.UbqM1–1:1:19 (Allele–2)	144	1010	*Z. mais subsp. Mexicana*	Intrón	
EXP–Zm.UbqM1:1:8 (Allele–3)	145	2008	*Z. mais subsp. Mexicana*	EXP: P–Zm.UbqM1–1:1:5 (SEQ ID NO: 50); L–Zm.UbqM1–1:1:4 (SEQ ID NO: 51); I–Zm.UbqM1–1:1:15 (SEQ ID NO: 146)	PCR0145916, pMON129211
I–Zm.UbqM1–1:1:15 (Allele–3)	146	1053	*Z. mais subsp. Mexicana*	Intrón	

000097

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
EXP–Zm.UbqM1:1:9 (Allele–3)	147	2008	*Z. mais subsp. Mexicana*	EXP: P–Zm.UbqM1–1:1:5 (SEQ ID NO: 50); L–Zm.UbqM1–1:1:4 (SEQ ID NO: 51); I–Zm.UbqM1–1:1:16 (SEQ ID NO: 148)	
I–Zm.UbqM1–1:1:16 (Allele–3)	148	1053	*Z. mais subsp. Mexicana*	Intrón	
EXP–Zm.UbqM1:1:11 (Allele–3)	149	2008	*Z. mais subsp. Mexicana*	EXP: P–Zm.UbqM1–1:1:5 (SEQ ID NO: 50); L–Zm.UbqM1–1:1:4 (SEQ ID NO: 51); I–Zm.UbqM1–1:1:18 (SEQ ID NO: 150)	pMON131962, pMON132047
I–Zm.UbqM1–1:1:18	150	1053	*Z. mais subsp.*	Intrón	

C00098

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
(Allele–3)			*Mexicana*		
EXP–Sb.Ubq4:1:2	151	1635	*S. bicolor*	EXP: P–Sb.Ubq4–1:1:1 (SEQ ID NO: 56); L–Sb.Ubq4–1:1:1 (SEQ ID NO: 57); I–Sb.Ubq4–1:1:2 (SEQ ID NO: 152)	pMON140886, PCR0145921, pMON129219, pMON132932
I–Sb.Ubq4–1:1:2	152	1080	*S. bicolor*	Intrón	
EXP–Sb.Ubq6:1:2	153	2067	*S. bicolor*	EXP: P–Sb.Ubq6–1:1:1 (SEQ ID NO: 64); L–Sb.Ubq6–1:1:1 (SEQ ID NO: 57); I–Sb.Ubq6–1:1:2 (SEQ ID NO: 154)	pMON140887, PCR0145920, pMON129218,

000099

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
					pMON132931
I–Sb.Ubq6–1:1:2	154	1076	*S. bicolor*	Intrón	
EXP–Sb.Ubq6:1:3	155	2067	*S. bicolor*	EXP: P–Sb.Ubq6–1:1:1 (SEQ ID NO: 64); L–Sb.Ubq6–1:1:1 (SEQ ID NO: 57); I–Sb.Ubq6–1:1:3 (SEQ ID NO: 1569)	pMON132931
I–Sb.Ubq6–1:1:3	156	1076	*S. bicolor*	Intrón	
EXP–Sb.Ubq7:1:2	157	2003	*S. bicolor*	EXP: P–Sb.Ubq7–1:1:1 (SEQ ID NO: 66); L–Sb.Ubq7–1:1:1 (SEQ ID NO: 67); I–Sb.Ubq7–1:1:A (SEQ ID NO: 158)	pMON132974

CC0100

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
I–Sb.Ubq7–1:1:2	158	1361	*S. bicolor*	Intrón	
EXP–SETit.Ubq1:1:E	180	2625	*S. italica*	EXP: P–SETit.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO: 64); L–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I–SETit.Ubq1–1:1:5 (SEQ ID NO: 127)	
EXP–Zm.UbqM1:1:13 (Allele–3)	181	2008	*Z. mais subsp. Mexicana*	EXP: P–Zm.UbqM1–1:1:5 (SEQ ID NO: 50); L–Zm.UbqM1–1:1:4 (SEQ ID NO: 51); I–Zm.UbqM1–1:1:20 (SEQ ID NO: 182)	
I–Zm.UbqM1–1:1:20 (Allele–3)	182	1053	*Z. mais subsp. Mexicana*	Intrón	

600101

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Fuente género/especie	Descripción y/o elementos de regulación de EXP ligados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):	Constructos de plásmidos y amplicones que comprenden EXP
EXP–SETit.Ubq1:1:9	183	2625	*S. italica*	EXP: P–SETit.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO: 64); L–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 71); I–SETit.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 118)	

20102

Como se muestra en la Tabla 1, por ejemplo, la secuencia EXP regulatoria transcripcional denominada EXP–ANDge.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 1), con componentes aislados de *A. gerardii*, comprende un elemento promotor, P–ANDge.Ubq1–1:1:11 (SEQ ID NO: 2), unido operativamente 5′ a un elemento líder, L–ANDge.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 3), unido operativamente 5′ a un elemento intrón, I–ANDge.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 4). Otras EXP se ligan de modo similar, como se ilustra en la Tabla 1.

Como se muestra en la Tabla 1, el listado de secuencias y las FIGS. 1–7, se manipularon genéticamente las variantes de las secuencias promotoras de las especies *A. gerardii*, *E. ravennae, Z. mays* subsp. *mexicana, S. bicolor, C. lacryma–jobi*, *S. italica*, y *S. viridis* que comprenden fragmentos del promotor más cortos de, por ejemplo, P–ANDge.Ubq1–1:1:11 (SEQ ID NO:2), P–ERIra.Ubq1–1:1:10 (SEQ ID NO:19) u otros promotores respectivos de otras especies, y por ejemplo que producen P–ANDge.Ubq1–1:1:9 (SEQ ID NO: 6), P–ERIra.Ubq1–1:1:9 (SEQ ID NO: 23), P–CI.Ubq1–1:1:10 (SEQ ID NO: 96), P–SETit.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 76) y P–Sv.Ubq1–1:1:2 (SEQ ID NO: 38), así como otros fragmentos del promotor. P–SETit.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO: 74) comprende un cambio de nucleótido único con respecto a P–SETit.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 70). Asimismo, P–Sv.Ubq1–1:1:3 (SEQ ID NO: 40) comprende un cambio de nucleótido único con respecto a P–Sv.Ubq1–1:1:4 (SEQ ID NO: 135).

En algunos casos, se crearon variantes de intrones específicos por la alteración de los últimos 3′ nucleótidos de cada intrón respectivo siguiendo la secuencia 5′–AG–3′ de la unión de empalme del intrón 3′. Estas variantes de intrón se muestran en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de extremo 3´ de variantes de intrones.

Anotación	SEQ ID NO:	Nucleótidos de intrón de extremo 3' inmediatamente después de sitio de empalme 3´ AG
I–Cl.Ubq1–1:1:7	92	GTG
I–Cl.Ubq1–1:1:6	94	GTC
I–Cl.Ubq1–1:1:8	101	GCG
I–Cl.Ubq1–1:1:9	103	GAC
I–Cl.Ubq1–1:1:10	105	ACC
I–Cl.Ubq1–1:1:11	107	GGG
I–Cl.Ubq1–1:1:12	109	GGT
I–Cl.Ubq1–1:1:13	111	CGT
I–Cl.Ubq1–1:1:14	113	TGT
I–SETit.Ubq1–1:1:2	118	GTG
I–SETit.Ubq1–1:1:3	120	GGT
I–SETit.Ubq1–1:1:4	122	ACC
I–SETit.Ubq1–1:1:5	127	GGC
I–Sv.Ubq1–1:1:2	129	GTG
I–Sv.Ubq1–1:1:3	131	GGT
I–Zm.UbqM1–1:1:13 (Allele–1)	138	GTC
I–Zm.UbqM1–1:1:17 (Allele–1)	140	GGT

Anotación	SEQ ID NO:	Nucleótidos de intrón de extremo 3' inmediatamente después de sitio de empalme 3´ AG
I–Zm.UbqM1–1:1:14 (Allele–2)	142	GTC
I–Zm.UbqM1–1:1:19 (Allele–2)	144	GGT
I–Zm.UbqM1–1:1:15 (Allele–3)	146	GTC
I–Zm.UbqM1–1:1:18 (Allele–3)	148	GGT
I–Sb.Ubq6–1:1:2	154	GTG
I–Sb.Ubq6–1:1:3	156	GGT
I–Zm.UbqM1–1:1:20 (Allele–3)	182	CGG

También se listan en la Tabla 1 tres variantes alélicas aisladas usando los mismos conjuntos de cebador diseñados para la amplificación del ADN genómico de *Z. mays* subsp. *mexicana.* Las variantes alélicas de las secuencias EXP están compuestas de una secuencia que comparte alguna identidad en varias regiones de otras secuencias, pero también son evidentes inserciones, supresiones y apareamientos erróneos de nucleótidos dentro de cada promotor, líder y/o intrón de cada una de las secuencias EXP. La

secuencia EXP denominada EXP–Zm.UbqM1:1:1 (SEQ ID NO: 41) representa un primer alelo (Alelo–1) del grupo de elemento de expresión regulatorio de la transcripción del gen Ubq1 de *Z. mays* subsp. *mexicana*. Las secuencias EXP denominadas EXP–Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137) y EXP–Zm.UbqM1:1:10 (SEQ ID NO: 139) representan un primer alelo (Alelo–1), con la única diferencia entre las EXP que aparece en los últimos nucleótidos 3´ de cada intrón respectivo siguiendo la secuencia 5´–AG–3´ del unión de empalme del intrón 3´. La secuencia EXP denominada EXP–Zm.UbqM1:1:4 (SEQ ID NO: 45) representa un segundo alelo (Alelo–2) del grupo de elemento de expresión regulatorio de la transcripción del gen Ubq1 de *Z. mays* subsp. *mexicana*. Las secuencias EXP denominadas EXP–Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141) y EXP–Zm.UbqM1:1:12 (SEQ ID NO: 143) representan un segundo alelo (Alelo–2), con la única diferencia entre las EXP que aparece en los últimos nucleótidos 3´ de cada intrón respectivo siguiendo la secuencia 5´–AG–3´ de la unión de empalme del intrón 3´. Las secuencias EXP EXP–Zm.UbqM1:1:2 (SEQ ID NO: 49) y EXP–Zm.UbqM1:1:5 (SEQ ID NO: 53) representan un tercer alelo (Alelo–3) del grupo de elemento de expresión regulatorio de la transcripción del gen Ubq1 de *Z. mays* subsp. *mexicana* y comprenden una diferencia de nucleótido única en la posición 1034 dentro de sus respectivos intrones (G for I–Zm.UbqM1–1:1:11, SEQ ID NO: 52 y T for I–Zm.UbqM1–1:1:12, SEQ ID NO: 54). Las secuencias EXP denominadas EXP–Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145), EXP–Zm.UbqM1:1:9 (SEQ ID NO: 147), EXP–Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) y EXP–Zm.UbqM1:1:13 (SEQ ID NO: 181) también representan un tercer alelo (Alelo–3). El intrón de EXP–Zm.UbqM1:1:9, I–Zm.UbqM1–1:1:16 (SEQ ID NO: 148) comprende un residuo de timina en en la posición 1034,

mientras que los intrones de EXP–Zm.UbqM1:1:8, EXP–Zm.UbqM1:1:11 y EXP–Zm.UbqM1:1:13 (I–Zm.UbqM1–1:1:15, SEQ ID NO: 146; I–Zm.UbqM1–1:1:18, SEQ ID NO: 11 y; I–Zm.UbqM1–1:1:20, SEQ ID NO: 182) cada uno comprende un residuo de guanina en la posición 1034. Además, los últimos 3, nucleótidos 3´ de EXP–Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145) y EXP–Zm.UbqM1:1:9 (SEQ ID NO: 147) difieren de los de EXP–Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) y EXP–Zm.UbqM1:1:13 (SEQ ID NO: 181).

Ejemplo 2: Análisis de elementos regulatorios que dirigen GUS en los protoplastos de maíz.

Los protoplastos de hoja de maíz se transformaron con vectores de expresión de planta que contienen una secuencia EXP que conduce la expresión del transgén de ß–glucuronidasa (GUS) y se comparó la expresión de GUS en los protoplastos de hoja en los que la expresión de GUS está dirigida por promotores constitutivos conocidos.

La expresión de un transgén dirigida por EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22) o EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) se comparó con la expresión de promotores constitutivos conocidos. Las secuencias EXP anteriores se clonaron en vectores de expresión de planta como se muestra en la siguiente Tabla 3 para producir vectores en los que una secuencia EXP está unida operativamente 5´ a un indicador ß–glucuronidasa (GUS) que contenía un intrón procesable (denominado como GUS–2, SEQ ID NO: 160) derivado del gen ST–LS1 específico de tejido inducible por la luz de papa (Acceso GenBank: X04753) o una secuencia codificadora de GUS contigua (GUS–1, SEQ ID NOS: 159), que estaba unida operativamente UTR 5´ a 3´ derivada del

gen de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T–AGRtu.nos–1:1:13, SEQ ID NO: 161) o el gen Hsp17 de trigo (T–Ta.Hsp17–1:1:1, SEQ ID NO: 162).

Tabla 3. Constructo del plásmido de expresión de planta GUS y la correspondiente secuencia EXP, secuencia codificadora de GUS y 3´ UTR usados para la transformación de protoplastos de hoja de maíz. "SEQ ID NO:" se refiere a una secuencia EXP dada.

Plásmido	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	3´ UTR
pMON19469	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
pMON65328	EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	GUS–2	T–Ta.Hsp17–1:1:1
pMON25455	EXP–Os.Act1:1:9	179	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
pMON122605	EXP–Os.TubA–3:1:1	165	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
pMON136264	EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
pMON136259	EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13

Plásmido	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	3′ UTR
pMON136263	EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
pMON136258	EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13

Los plásmidos de control (pMON19469, pMON65328, pMON25455 y pMON122605) usados para la comparación se construyeron como se describió antes y contienen una secuencia EXP conocida: EXP–CaMV.35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170), EXP–CaMV.35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1(SEQ ID NO: 163), EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179), o EXP–Os.TubA–3:1:1 (SEQ ID NO: 165), respectivamente, unido operativamente 5′ a una secuencia codificadora de GUS y 3′ UTR. Se proporcionaron tres controles adicionales para evaluar la expresión umbral de GUS y luciferasa: un control sin ADN, un vector vacío que no está diseñado para expresión del transgén, y un vector de expresión usado para expresar la proteína fluorescente verde (GFP).

También se construyeron dos plásmidos, para usar en la co–transformación y normalización de datos, usando métodos conocidos en la técnica. Cada plásmido contenía una secuencia codificadora de luciferasa específica que fue dirigida por una secuencia EXP constitutiva. El vector de planta pMON19437 comprende un casete del transgén con un promotor

constitutivo unido operativamente 5´ a un intrón, (EXP–CaMV.35S–mej+Zm.DnaK:1:1, SEQ ID NO: 170), unido operativamente 5´ a una secuencia codificadora de luciferas de luciérnaga (*Photinus pyralis*) a (LUCIFERASE:1:3, SEQ ID NO: 166), unida operativamente 5´ a una UTR 3´ del gen de nopalina sintasa *de Agrobacterium tumefaciens* (T–AGRtu.nos–1:1:13, SEQ ID NO: 161). El vector de planta pMON63934 comprende un casete del transgén con una secuencia EXP constitutiva (EXP–CaMV.35S–enh–Lhcb1, SEQ ID NO: 168), unido operativamente 5´ a una secuencia codificadora de luciferasa de pensamiento de mar (*Renilla reniformis*) (CR–Ren.hRenilla Lucife–0:0:1, SEQ ID NO: 167), unido operativamente 5´ a una UTR 3' del gen de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (T–AGRtu.nos–1:1:13, SEQ ID NO: 161).

Los protoplastos de hoja de maíz se transformaron usando un método de transformación basado en PEG, que es bien conocido en la técnica. Las células protoplásticas se transformaron con ADN del plásmido pMON19437, ADN del plásmido pMON63934, y una cantidad equimolar de uno de los plásmidos presentados en la Tabla 3 y se incubaron toda la noche en oscuridad total. Las mediciones de GUS y luciferasa se realizaron colocando alícuotas de una preparación de células lisadas transformadas como antes en dos placas de pocillos pequeños. Una placa se usó para las mediciones de GUS, y una segunda placa se usó para realizar un ensayo de luciferasa dual usando un sistema de ensayo indicador de luciferasa dual (Promega Corp., Madison, WI; ver por ejemplo, Promega Notes Magazine, No: 57, 1996, p.02). Se realizaron una a dos transformaciones para cada secuencia y se determinaron los valores de expresión promedio para cada secuencia EXP a partir de varias muestras de cada experimento de transformación. Las mediciones de la muestra se

000111

realizaron usando cuatro replicados de cada transformación del constructo de la secuencia EXP, o alternativamente, tres replicados de cada constructo de la secuencia EXP por uno de los dos experimentos de transformación. Los niveles de expresión promedio de GUS y luciferasa se proporcionan en la Tabla 4. En esta tabla, los valores de luciferasa de luciérnaga (*por ejemplo,* de la expresión de pMON19437) se proporcionan en la columna marcada "FLuc" y los valores de luciferasa de *Renilla* luciferase proporcionan en la columna marcada como "RLuc".

Tabla 4. Actividad de GUS y Luciferasa en células protoplásticas de hoja de maíz transformadas.

Plásmido	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	Gus	RLuc	FLuc
pMON19469	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	789147	298899	36568
pMON65328	EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	508327	158227	17193
pMON25455	EXP–Os.Act1:1:9	179	460579	183955	53813
pMON122605	EXP–Os.TubA–3:1:1	165	25082	25821	21004
pMON136264	EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	926083	101213	23704
pMON136259	EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	845274	193153	51479
pMON136263	EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	901985	132765	41313
pMON136258	EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	1011447	210635	66803

Para comparar la actividad relativa de cada secuencia EXP, los valores de GUS se expresaron como una relación de actividad de Gus a luciferasa y se normalizaron con respecto a los niveles expresión observados para la secuencia de EXP EXP–Os.TubA–3:1:1 (SEQ ID NO: 165). La siguiente Tabla 5 muestra las relaciones de expresión de GUS/RLu normalizada con respecto a la expresión e EXP–Os.TubA–3:1:1 en los protoplastos de maíz.

Como se puede observar en la Tabla 5, la expresión de GUS, dirigida por EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22) o EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) fue 4,51 a 9,42 veces más alta que la expresión de GUS dirigida por EXP–Os.TubA–3:1:1 (SEQ ID NO: 165). La expresión de GUS dirigida por EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22) o EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) también fue más alta que la de EXP–CaMV.35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170), EXP–CaMV.35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163), o EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179).

Tabla 5. Veces de expresión de GUS/RLuc con respecto de la expresión de EXP–Os.TubA–3:1:1 en células protoplásticas de hoja de maíz.

Plásmido	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	Gus/RLuc	Gus/RLuc Normalizado con respecto a EXP–Os.TubA–3:1:1
pMON19469	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	2,640000	2,72
pMON65328	EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	3,210000	3,31
pMON25455	EXP–Os.Act1:1:9	179	2,500000	2,57
pMON122605	EXP–Os.TubA–3:1:1	165	0,971000	1,00
pMON136264	EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	9,150000	9,42
pMON136259	EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	4,380000	4,51
pMON136263	EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	6,790000	6,99
pMON136258	EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	4,800000	4,94

La Tabla 6 muestra abajo relaciones de GUS/FLuc de expresión normalizada con respecto a la expresión de EXP–Os.TubA–3:1:1 en protoplastos de maíz.

Tabla 6. Expresión de pliegue GUS/FLuc respecto de la expresión de EXP–Os.TubA–3:1:1 en células de protoplastos de hojas de maíz.

Plasmid	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	Gus/FLuc	Normalizdo con respecto a EXP–Os.TubA–3:1:1
pMON19469	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	21,600000	18,15
pMON65328	EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	29,600000	24,87
pMON25455	EXP–Os.Act1:1:9	179	8,560000	7,19
pMON122605	EXP–Os.TubA–3:1:1	165	1,190000	1,00
pMON136264	EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	39,100000	32,86
pMON136259	EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	16,400000	13,78
pMON136263	EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	21,800000	18,32
pMON136258	EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	15,100000	12,69

Como se puede observar en la Tabla 6, la expresión de GUS, dirigida por EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22) o EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) demostró la misma tendencia general cuando se expresa como la relación de los valores de GUS/FLuc y se normaliza con respecto a EXP–Os.TubA–3:1:1 (SEQ ID NO: 165). La expresión fue 12,69 a 32,86 veces más

alta que la expresión de GUS dirigida por EXP–Os.TubA–3:1:1 (SEQ ID NO: 165). La expresión de GUS dirigida por EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22) o EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) también fue más alta en ciertas comparaciones que la de EXP–CaMV.35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170), EXP–CaMV.35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163), o EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179).

Ejemplo 3: Análisis de los elementos regulatorios que dirigen GUS en los protoplastos de maíz usando amplicones del casete del transgén de GUS.

Los protoplastos de hoja de maíz se transformaron con amplicones de ADN derivados de vectores de expresión de planta que contienen una secuencia EXP, que dirige la expresión del transgén de ß–glucuronidasa (GUS), y compararon con el protoplasto de hoja en los que la expresión de GUS está dirigida por promotores constitutivos conocidos en una serie de experimentos que se presentan a continuación.

En un primer conjunto de experimentos, las células protoplásticas de maíz, derivadas del tejido foliar se transformaron como antes con amplicones producidos de la amplificación de casetes del transgén de GUS que comprenden los vectores de expresión de planta para comparar la expresión de un transgén (GUS) dirigida por una de EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP–ERIra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–

ERIra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP–ERIra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP–SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), EXP–SETit.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 123), EXP–SETit.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 124), EXP–Sv.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 128), EXP–Sv.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 132), EXP–Sv.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 134), EXP–Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), EXP–Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), EXP–Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151), EXP–Sb.Ubq6:1:2 (SEQ ID NO: 153) y EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98) con la de los promotores constitutivos conocidos. Cada secuencia EXP que comprende la amplificación del molde del cual se produce el amplicón del casete del transgén se clonó usando métodos conocidos en la técnica en un vector de planta de expresión mostrado en la siguiente Tabla 7 bajo el título de "Molde del amplicón". Los vectores de expresión de planta resultantes comprenden un casete del transgén compuesto de una secuencia EXP, unida operativamente 5′ a una secuencia codificadora para ß–glucuronidasa (GUS) que contiene un intrón procesable ("GUS–2" como se describe en el anterior Ejemplo 2), o una secuencia codificadora de GUS contigua ("GUS–1", como se describió antes), unido operativamente 5′ a una UTR 3' de T–AGRtu.nos–1:1:13 o T–Ta.Hsp17–1:1:1, como también se indicó anteriormente. Los amplicones se produjeron usando métodos conocidos por los expertos en la técnica usando los moldes del constructo del plásmido presentados en la siguiente Tabla 7. En breves palabras, se diseñó un cebador de oligonucleótido 5′ para aparearse con la secuencia promotora y se usó un cebador de oligonucleótido 3′, que se aparea en el extremo 3′ de la UTR 3' para la amplificación de cada casete del transgén. Se introdujeron sucesivas supresiones 5′ en las secuencias promotoras que comprenden los casetes del transgén, que dan origen a

diferentes secuencias de EXP, por el uso de diferentes cebadores de oligonucleótidos que se diseñaron para aparearse en diferentes posiciones dentro de la secuencia promotora que comprende cada molde de amplicón.

Tabla 7. Amplicones de expresión de planta de GUS y correspondientes moldes del amplicón del constructo de plásmido, secuencia EXP, secuencia codificadora de GUS y UTR 3' usadas para la transformación de protoplastos de hoja de maíz.

Amplicón ID	Plantilla de amplicón	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	Secuencia codif. GUS	3' UTR
PCR0145942	pMON25455	EXP-Os.Act1:1:9	179	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
PCR0145941	pMON33449	P-CAMV,35S-ENH-1:1:102/L-CAMV,35S-1:1:2	169	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
PCR0145943	pMON65328	EXP-CaMV,35S-mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	GUS-2	T-Ta.Hsp17-1:1:1

Amplicón ID	Plantilla de amplicón	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	Secuencia codif. GUS	3´ UTR
PCR0145944	pMON81552	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145892	pMON136264	EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145815	pMON136264	EXP–ANDge.Ubq1:1:10	10	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145893	pMON136259	EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145817	pMON136264	EXP–ANDge.Ubq1:1:11	14	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13

Amplicón ID	Plantilla de amplicón	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	Secuencia codif. GUS	3´ UTR
PCR0145819	pMON136264	EXP–ANDge.Ubq1:1:12	16	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145896	pMON136263	EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145820	pMON136263	EXP–ERIra.Ubq1:1:10	25	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145897	pMON136258	EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145821	pMON136263	EXP–ERIra.Ubq1:1:11	29	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13

Amplicón ID	Plantilla de amplicón	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	Secuencia codif. GUS	3´ UTR
PCR0145822	pMON136263	EXP–ERIra.Ubq1:1:12	31	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145900	pMON140877	EXP–SETit.Ubq1:1:5	117	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145928	pMON140877	EXP–SETit.Ubq1:1:7	123	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145905	pMON140877	EXP–SETit.Ubq1:1:6	124	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145909	pMON140878	EXP–Sv.Ubq1:1:7	128	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13

Amplicón ID	Plantilla de amplicón	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	Secuencia codif. GUS	3´ UTR
PCR0145929	pMON140878	EXP–Sv.Ubq1:1:8	132	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145911	pMON140878	EXP–Sv.Ubq1:1:10	134	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145914	pMON140881	EXP–Zm.UbqM1:1:6	137	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145915	pMON140882	EXP–Zm.UbqM1:1:7	141	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145921	pMON140886	EXP–Sb.Ubq4:1:2	151	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13

Amplicón ID	Plantilla de amplicón	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	Secuencia codif. GUS	3´ UTR
PCR0145920	pMON140887	EXP–Sb.Ubq6:1:2	153	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13
PCR0145922	pMON140889	EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	GUS–1	T–AGRtu.nos–1:1:13

Los constructos de plásmido listados como moldes de amplicón en la Tabla 7 actuaron como moldes para la amplificación de los casetes de expresión del transgén que comprenden las secuencias EXP listadas de la Tabla 7. Los plásmidos de control usados para generar los amplicones del transgén de GUS para comparación se construyeron como describió previamente con secuencias EXP constitutivas descriptas en el Ejemplo 2. También se usaron controles negativos para la determinación de GUS y luciferasa umbral, un control sin ADN, y una muestra de control en la que se usan dos plásmidos de luciferasa en la transformación junto con un ADN de plásmido que no expresa una secuencia codificadora. Los plásmidos pMON19437 y pMON63934, que se describieron en el Ejemplo 2, también se emplearon para la cotransformación y normalización de datos.

Los protoplastos de hoja de maíz se transformaron usando un método de transformacion basado en PEG que se describió en el Ejemplo 2 anterior. La siguiente Tabla 8 muestra los valores de expresión de GUS y luciferasa promedio determinados para cada casete del transgén.

Tabla 8. Actividad de GUS y luciferasa promedio en células protoplásticas de hoja de maíz transformadas.

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	RLuc	FLuc
EXP–Os.Act1:1:9	179	1540,3	105416,8	2671,8
P–CAMV,35S–ENH–1:1:102/L–CAMV,35S–1:1:2	169	10426,3	344088,6	8604,1
EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	12530,8	137722,6	3067,1
EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	61036,1	208125,3	5787,6
EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	59447,4	84667,6	2578,4
EXP–ANDge.Ubq1:1:10	10	40123,3	76753,8	2419,8
EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	42621,0	121751,3	3974,8
EXP–ANDge.Ubq1:1:11	14	44358,5	87105,8	2687,1
EXP–ANDge.Ubq1:1:12	16	48219,0	107762,1	3279,6
EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	31253,0	171684,1	6476,1
EXP–ERIra.Ubq1:1:10	25	7905,8	21235,6	462,4
EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	39935,8	173766,6	5320,3
EXP–ERIra.Ubq1:1:11	29	34141,3	111626,8	3377,6
EXP–ERIra.Ubq1:1:12	31	11540,3	42362,1	1045,3

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	RLuc	FLuc
EXP–SETit.Ubq1:1:5	117	20496,5	88695,8	2358,8
EXP–SETit.Ubq1:1:7	123	75728,5	185223,8	4723,1
EXP–SETit.Ubq1:1:6	124	44148,3	161216,3	4962,1
EXP–Sv.Ubq1:1:7	128	15043,8	74670,6	1888,3
EXP–Sv.Ubq1:1:8	132	31997,8	113787,1	3219,8
EXP–Sv.Ubq1:1:10	134	38952,8	220208,6	7011,3
EXP–Zm.UbqM1:1:6	137	30528,3	90113,1	2453,6
EXP–Zm.UbqM1:1:7	141	34986,3	105724,7	2553,8
EXP–Sb.Ubq4:1:2	151	9982,3	72593,8	2171,6
EXP–Sb.Ubq6:1:2	153	33689,0	114709,6	3879,6
EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	50622,3	107084,3	2621,3

Para comparar la actividad relativa de cada secuencia EXP, los valores de GUS se expresaron como una relación de actividad de Gus a luciferasa y se normalizaron con respecto a los niveles de expresión observados para EXP–Os.Act1:1:1 y EXP–CaMV.35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1. La siguiente Tabla 9 muestra las relaciones de expresión de GUS/RLuc normalizada con respecto a la expresión dirigida por EXP–Os.Act1:1:1 y EXP–CaMV.35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 en los protoplastos de maíz. La siguiente Tabla 10 muestra las relaciones de expresión de GUS/RLucc normalizada con respecto a la expresión dirigida de EXP–Os.Act1:1:1 y EXP–CaMV.35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 en protoplastos de maíz.

Tabla 9. Relaciones de expresión de GUS/RLuc y GUS/FLuc normalizada con respecto a EXP–CaMV.35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163) en protoplastos de maíz.

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	GUS/FLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1
EXP–Os.Act1:1:9	179	0,16	0,14
P–CAMV,35S–ENH–1:1:102/L–CAMV,35S–1:1:2	169	0,33	0,30
EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	1,00	1,00
EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	3,22	2,58
EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	7,72	5,64
EXP–ANDge.Ubq1:1:10	10	5,75	4,06
EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	3,85	2,62
EXP–ANDge.Ubq1:1:11	14	5,60	4,04
EXP–ANDge.Ubq1:1:12	16	4,92	3,60
EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	2,00	1,18
EXP–ERIra.Ubq1:1:10	25	4,09	4,18
EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	2,53	1,84
EXP–ERIra.Ubq1:1:11	29	3,36	2,47

EXP–ERIra.Ubq1:1:12	31	2,99	2,70
EXP–SETit.Ubq1:1:5	117	2,54	2,13
EXP–SETit.Ubq1:1:7	123	4,49	3,92
EXP–SETit.Ubq1:1:6	124	3,01	2,18
EXP–Sv.Ubq1:1:7	128	2,21	1,95
EXP–Sv.Ubq1:1:8	132	3,09	2,43
EXP–Sv.Ubq1:1:10	134	1,94	1,36
EXP–Zm.UbqM1:1:6	137	3,72	3,05
EXP–Zm.UbqM1:1:7	141	3,64	3,35
EXP–Sb.Ubq4:1:2	151	1,51	1,13
EXP–Sb.Ubq6:1:2	153	3,23	2,13
EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	5,20	4,73

Tabla 10. Relaciones de GUS/RLuc y GUS/FLuc de expresión normalizada con respecto a EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) en protoplastos de hojas de maíz.

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc con respecto a EXP–Os.Act1:1:9	GUS/FLuc con respecto a EXP–Os.Act1:1:9
EXP–Os.Act1:1:9	179	1,00	1,00
P–CAMV,35S–ENH–1:1:102/L–CAMV,35S–1:1:2	169	2,07	2,10
EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	6,23	7,09

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc con respecto a EXP–Os.Act1:1:9	GUS/FLuc con respecto a EXP–Os.Act1:1:9
EXP–CaMV,35S–me|+Zm.DnaK:1:1	170	20,07	18,29
EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	48,05	39,99
EXP–ANDge.Ubq1:1:10	10	35,78	28,76
EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	23,96	18,60
EXP–ANDge.Ubq1:1:11	14	34,85	28,64
EXP–ANDge.Ubq1:1:12	16	30,62	25,50
EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	12,46	8,37
EXP–ERIra.Ubq1:1:10	25	25,48	29,66
EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	15,73	13,02
EXP–ERIra.Ubq1:1:11	29	20,93	17,53
EXP–ERIra.Ubq1:1:12	31	18,64	19,15
EXP–SETit.Ubq1:1:5	117	15,82	15,07
EXP–SETit.Ubq1:1:7	123	27,98	27,81
EXP–SETit.Ubq1:1:6	124	18,74	15,43
EXP–Sv.Ubq1:1:7	128	13,79	13,82
EXP–Sv.Ubq1:1:8	132	19,25	17,24
EXP–Sv.Ubq1:1:10	134	12,11	9,64
EXP–Zm.UbqM1:1:6	137	23,19	21,58
EXP–Zm.UbqM1:1:7	141	22,65	23,76
EXP–Sb.Ubq4:1:2	151	9,41	7,97
EXP–Sb.Ubq6:1:2	153	20,10	15,06

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc con respecto a EXP–Os.Act1:1:9	GUS/FLuc con respecto a EXP–Os.Act1:1:9
EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	32,35	33,50

En un segundo conjunto de experimentos, un amplicón del casete de GUS que comprende la secuencia EXP EXP–Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145) se comparó con los amplicones de control, PCR0145942 (EXP–Os.Act1:1:9, SEQ ID NO: 179) y PCR0145944 (EXP–CaMV.35S–mej+Zm.DnaK:1:1, SEQ ID NO: 170) con respecto a la expresión de GUS. La expresión de GUS dirigida por la secuencia EXP EXP–Zm.UbqM1:1:8 fue más alta que la de los dos controles. La siguiente Tabla 11 muestra los valores promedio de GUS y luciferasa determinados para cada amplicón. La siguiente Tabla 12 muestra las relaciones de expresión de GUS/RLuc y GUS/FLuc normalizadas con respecto a la expresión dirigida de EXP–Os.Act1:1:9 y EXP–CaMV.35S–mej+Zm.DnaK:1:1 en protoplastos de maíz.

Tabla 11. Actividad media de GUS y Luciferasa en células de protoplastos transformadas de hojas de maíz.

Amplicón	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	RLuc	FLuc
PCR014594	EXP–Os.Act1:1:9	179	1512,2	19046	11333,

2			5	1	8
PCR014594 4	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	41176, 5	33083 7	13885, 8
PCR014591 6	EXP–Zm.UbqM1:1:8	145	79581, 5	33075 6	15262, 5

Tabla 12. Relaciones de GUS/RLuc y GUS/FLuc de expresión normalizada con respecto a EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) en protoplastos de hojas de maíz.

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/FLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/RLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	GUS/FLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1
EXP–Os.Act1:1:9	179	1,00	1,00	0,06	0,04
EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	15,68	22,22	1,00	1,00
EXP–Zm.UbqM1:1:8	145	30,30	39,08	1,93	1,76

En un tercer conjunto de experimentos, los casetes del transgén del amplicón GUS se obtuvieron como se describió antes y se analizaron para determinar la expresión dirigida por las secuencias EXP, EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–

Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) y EXP–Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116). Los amplicones estaban compuestos de una secuencia EXP unida operativamente a la secuencia codificadora de GUS–1 que estaba unida operativamente a UTR 3' de T–AGRtu.nos–1:1:13. La expresión se comparó con los controles EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV.35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170). La siguiente Tabla 13 muestra los valores promedio de GUS y luciferasa determinados para cada amplicón. La siguiente Tabla 14 muestra las relaciones de expresión de GUS/RLuc normalizada con respecto a la expresión dirigida de EXP–Os.Act1:1:9 y EXP–CaMV.35S–mej+Zm.DnaK:1:1 en protoplastos de maíz.

Tabla 13. Actividad promedio de GUS y luciferasa en células protoplásticas de hoja de maíz transformadas.

Amplicón ID	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	RLuc
PCR0145942	EXP–Os.Act1:1:9	179	9445,25	929755
PCR0145944	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	78591,25	445127
PCR0146628	EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	192056,75	972642
PCR0145922	EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	175295,25	395563
PCR0145945	EXP–Cl.Ubq1:1:13	114	173674,5	402966
PCR0145946	EXP–Cl.Ubq1:1:14	115	185987,5	390052
PCR0145947	EXP–Cl.Ubq1:1:15	116	9435	320749

Tabla 14. Relación de GUS/RLuc y GUS/FLuc de expresión normalizada con respecto a EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) en protoplastos de hojas de maíz.

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/RLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1
EXP–Os.Act1:1:9	179	1,00	0,06
EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	17,38	1,00
EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	19,44	1,12
EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	43,62	2,51
EXP–Cl.Ubq1:1:13	114	42,43	2,44
EXP–Cl.Ubq1:1:14	115	46,94	2,70
EXP–Cl.Ubq1:1:15	116	2,90	0,17

Como se puede observar en la Tabla 14 anterior, las secuencias EXP EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) y EXP–Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) son capaces de dirigir la expresión del transgén. La expresión dirigida por EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114) y EXP–Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) fue más alta que la de ambos controles. La expresión dirigida por EXP–Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) fue menor que

EXP–CaMV.35S–enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) pero mayor que el control, EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179).

En un cuarto conjunto de experimentos, los casetes del transgén del amplicón GUS de obtuvieron como se describió antes y se analizaron para determinar la expresión dirigida por las secuencias EXP, EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–CI.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) y EXP–CI.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97). La expresión se comparó con los controles EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV.35S–enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170). La siguiente Tabla 15 muestra los valores promedio de GUS y luciferasa determinados para cada amplicón. La siguiente Tabla 16 muestra las relaciones de expresión de GUS/RLuc y GUS/FLuc normalizadas con respecto a la expresión dirigida de EXP–Os.Act1:1:9 y EXP–CaMV.35S–enh+Zm.DnaK:1:1 en protoplastos de maíz.

Tabla 15. Actividad promedio de GUS y luciferasa en células protoplásticas de hoja de maíz transformadas.

Amplicón ID	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	RLuc	FLuc
PCR0145942	EXP–Os.Act1:1:9	179	5333,5	171941,75	77817,88
PCR0145944	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	88517	177260,25	54207,38
PCR0145922	EXP–CI.Ubq1:1:10	98	130125,75	194216	32055
pMON146750	EXP–CI.Ubq1:1:16	93	134101,75	182317,5	32434,5
pMON146751	EXP–CI.Ubq1:1:17	97	107122,5	151783,25	51354,38

000133

Tabla 16. Relaciones de GUS/RLuc y GUS/FLuc de expresión normalizada con respecto a EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) en protoplastos de hojas de maíz.

Amplicón ID	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/FLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/RLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	GUS/FLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1
PCR0145942	EXP–Os.Act1:1:9	179	1,00	1,00	0,06	0,04
PCR0145944	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	16,10	23,83	1,00	1,00
PCR0145922	EXP–CI.Ubq1:1:10	98	21,60	59,23	1,34	2,49

pMON14675 0	EXP–Cl.Ubq1:1:16	93	23,71	60,32	1,47	2,53
pMON14675 1	EXP–Cl.Ubq1:1:17	97	22,75	30,43	1,41	1,28

Como se puede observar en la Tabla 16, las secuencias EXP EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) y EXP–Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) pudieron dirigir la expresión del transgén. La expresión dirigida por cada una de las secuencias EXP fue más alta que la de ambos controles.

En un quinto conjunto de experimentos, casetes del transgén del amplicón de GUS se obtuvieron como se describió antes de analizar la expresión dirigida por las secuencias EXP, EXP–Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) y EXP–Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108). La expresión se comparó con los controles EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163). La siguiente Tabla 17 muestra los valores promedio de GUS y luciferasa determinados para cada amplicón. La siguiente Tabla 18 muestra las relaciones de expresión de GUS/RLuc normalizada con respecto a la expresión dirigida EXP–Os.Act1:1:9 y EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 en los protoplastos de maíz.

Tabla 17. Actividad promedio de GUS y luciferasa en células protoplásticas de hoja de maíz transformadas.

Plantilla	Amplicón	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	RLuc
pMON65328	PCR0145943	EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	70352,00	7902 8,75
pMON25455	PCR0145942	EXP–Os.Act1:1:9	179	33155,25	9233 7,00
pMON131962	pMON131962	EXP–Zm.UbqM1:1:11	149	18814,75	3366 3,00
pMON132047	pMON132047	EXP–Cl.Ubq1:1:23	108	15387,50	4099 5,50

Tabla 18. Relaciones de GUS/RLuc de expresión normalizada con respecto a EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163) en protoplastos de hojas de maíz.

Amplicon	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/RLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1
PCR0145943	EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	2,48	1,00
PCR0145942	EXP–Os.Act1:1:9	179	1,00	0,40
pMON131962	EXP–Zm.UbqM1:1:11	149	1,56	0,63
pMON132047	EXP–Cl.Ubq1:1:23	108	1,05	0,42

Como se puede observar en la Tabla 18 anterior, las secuencias EXP, EXP–Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) y EXP–Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108) pudieron dirigir la expresión de GUS en los protoplastos de hoja de maíz. La expresión fue similar a la del control, EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y menor que la de EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163).

La eficacia de los elementos regulatorios que dirigen la expresión de GUS a partir de los amplicones se puede estudiar de modo similar en los

protoplastos de hoja de caña de azúcar. Por ejemplo, los protoplastos de caña de azúcar se pueden transformar con amplicones de ADN derivados de vectores de expresión de planta que contienen una secuencia EXP, que dirige la expresión del transgén de ß–glucuronidasa (GUS), y se compararon con el protoplasto de hoja en los que la expresión de GUS está dirigida por promotores constitutivos conocidos. Asimismo, los elementos regulatorios que dirigen la expresión de CP4 a partir de los amplicones en protoplastos de maíz o trigo se pueden estudiar de modo similar.

Ejemplo 4: Análisis de elementos regulatorios que dirigen GUS en protoplastos de trigo usand amplicones de casete del transgén de GUS.

Los protoplastos de hoja de trigo se transformaron con amplicones de ADN derivados de los vectores de expresión de planta que contienen una secuencia EXP, que dirige la expresión del transgén de ß–glucuronidasa (GUS), y se compararon con el protoplasto de hoja en que la expresión de GUS fue dirigido por los promotores constitutivos conocidos.

Las células protoplásticas de trigo derivadas del tejido foliar se transformaron usando métodos conocidos en la técnica con amplicones producidos de la amplificación de los casetes del transgén de GUS que comprenden vectores de expresión de planta para comparar la expresión de un transgén (GUS) dirigido por las secuencias EXP listadas en las Tablas 10–11 con la de los promotores constitutivos conocidos con la metodología descripta en un ejemplo previo (Ejemplo 3), usando los mismos amplicones del casete de GUS que se usaron para el ensayo en maíz en el Ejemplo 3 anterior. Los amplicones del casete de GUS control y los plásmidos de luciferasa usados para la transformación de protoplastos del trigo fueron los mismos que los

presentados en el ejemplo previo y se proporcionaron en la anterior Tabla 7 del Ejemplo 3. Asimismo, se usaron controles negativos para la determinación de GUS y luciferasa umbral, como se describió antes. Los protoplastos de hoja de trigo se transformaron usando un método de transformación basado en PEG, que se describió antes en el Ejemplo 3. La Tabla 19 lista actividad promedio de GUS y LUC observada en las células protoplásticas de hoja de trigo transformadas, y la Tabla 20 muestra las relaciones de expresión de GUS/RLuc normalizadas en protoplastos de trigo.

Tabla 19. Actividad promedio de GUS y luciferasa en las células protoplásticas de hoja de trigo transformadas.

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	RLuc	GUS/RLuc
EXP–Os.Act1:1:9	179	2976,33	53334,8	0,0558047
P–CAMV,35S–ENH–1:1:102/L–CAMV,35S–1:1:2	169	1431,33	55996,1	0,0255612
EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	29299,3	50717,4	0,5776973
EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	34294,3	63307,9	0,5417066
EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	68444,3	60329,1	1,1345158
EXP–ANDge.Ubq1:1:10	10	60606,3	60659,4	0,9991245
EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	33386,3	56712,1	0,5886984
EXP–ANDge.Ubq1:1:11	14	43237,3	48263,4	0,8958609
EXP–ANDge.Ubq1:1:12	16	51712,7	64702,8	0,7992341
EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	20998,3	60273,4	0,3483845

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	RLuc	GUS/RLuc
EXP–ERIra.Ubq1:1:10	25	17268,3	25465,4	0,6781084
EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	34635,7	59467,1	0,5824341
EXP–ERIra.Ubq1:1:11	29	28979	56153,8	0,516065
EXP–ERIra.Ubq1:1:12	31	41409,7	55152,4	0,7508221
EXP–SETit.Ubq1:1:5	117	39427,7	57463,1	0,6861388
EXP–SETit.Ubq1:1:7	123	108091	49330,4	2,191169
EXP–SETit.Ubq1:1:6	124	58703	46110,1	1,2731047
EXP–Sv.Ubq1:1:7	128	29330	43367,1	0,676319
EXP–Sv.Ubq1:1:8	132	53359	40076,4	1,3314306
EXP–Sv.Ubq1:1:10	134	49122,7	53180,8	0,9236922
EXP–Zm.UbqM1:1:6	137	37268	54088,1	0,6890239
EXP–Zm.UbqM1:1:7	141	51408	47297,4	1,0869087
EXP–Sb.Ubq4:1:2	151	35660,3	62591,1	0,5697347
EXP–Sb.Ubq6:1:2	153	27543	57826,4	0,4763046
EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	54493,3	41964,1	1,2985699

Tabla 20. Relaciones de GUS/RLuc de expresión normalizada con respecto a EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163) en protoplastos de hojas de trigo.

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc con respecto a EXP–Os.Act1:1:9	GUS/RLuc con respecto a EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1
EXP–Os.Act1:1:9	179	1,00	0,10
P–CAMV,35S–ENH–1:1:102/L–CAMV,35S–1:1:2	169	0,46	0,04
EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	10,35	1,00
EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	9,71	0,94
EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	20,33	1,96
EXP–ANDge.Ubq1:1:10	10	17,90	1,73
EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	10,55	1,02
EXP–ANDge.Ubq1:1:11	14	16,05	1,55
EXP–ANDge.Ubq1:1:12	16	14,32	1,38
EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	6,24	0,60
EXP–ERIra.Ubq1:1:10	25	12,15	1,17
EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	10,44	1,01

EXP–ERIra.Ubq1:1:11	29	9,25	0,89
EXP–ERIra.Ubq1:1:12	31	13,45	1,30
EXP–SETit.Ubq1:1:5	117	12,30	1,19
EXP–SETit.Ubq1:1:7	123	39,26	3,79
EXP–SETit.Ubq1:1:6	124	22,81	2,20
EXP–Sv.Ubq1:1:7	128	12,12	1,17
EXP–Sv.Ubq1:1:8	132	23,86	2,30
EXP–Sv.Ubq1:1:10	134	16,55	1,60
EXP–Zm.UbqM1:1:6	137	12,35	1,19
EXP–Zm.UbqM1:1:7	141	19,48	1,88
EXP–Sb.Ubq4:1:2	151	10,21	0,99
EXP–Sb.Ubq6:1:2	153	8,54	0,82
EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	23,27	2,25

En un segundo conjunto de experimentos, los casetes del transgén del amplicón de GUS se obtuvieron como se describió antes y se analizaron para determinar la expresión dirigida por las secuencias EXP, EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) y EXP–Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116). Los amplicones estaban compuestos de una secuencia EXP unida operativamente a la secuencia codificadora de GUS–1 que estaba unida operativamente al UTR 3' de T–AGRtu.nos–1:1:13. La expresión se comparó con los controles EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV.35S–enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170). La siguiente Tabla 21 muestra los valores promedio de GUS y luciferasa determinados para cada

amplicón. La Tabla 22 siguiente muestra las relaciones de expresión de GUS/RLuc normalizada con respecto a Expresión dirigida en EXP–Os.Act1:1:9 y EXP–CaMV.35S–enh+Zm.DnaK:1:1 en protoplastos de maíz.

Tabla 21. Actividad promedio de GUS y luciferasa en las células protoplásticas de hoja de trigo transformadas.

Amplicón ID	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	RLuc
PCR014594 2	EXP–Os.Act1:1:9	179	1234	176970, 5
PCR014594 4	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	12883, 5	119439
PCR014662 8	EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	38353, 3	171535, 3
PCR014592 2	EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	34938	154245, 8
PCR014594 5	EXP–Cl.Ubq1:1:13	114	32121	122220, 8
PCR014594 6	EXP–Cl.Ubq1:1:14	115	56814	143318, 3
PCR014594 7	EXP–Cl.Ubq1:1:15	116	1890,5	167178, 5

Tabla 22. Relaciones de GUS/RLuc y GUS/FLuc de expresión normalizada con respecto a EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) en protoplastos de hojas de trigo.

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/RLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1
EXP–Os.Act1:1:9	179	1,00	0,06
EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	15,47	1,00
EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	32,07	2,07
EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	32,48	2,10
EXP–Cl.Ubq1:1:13	114	37,69	2,44
EXP–Cl.Ubq1:1:14	115	56,85	3,68
EXP–Cl.Ubq1:1:15	116	1,62	0,10

Como se puede observar en la Tabla 22 anterior, las secuencias EXP EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) y EXP–Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) son capaces de dirigir la expresión del transgén. La expresión dirigida por EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114) y EXP–Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) fue más alta que la de ambos controles. La expresión dirigida por EXP–Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) fue menor que

EXP–CaMV.35S–enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) pero mayor que el control, EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179).

En un tercer conjunto de experimentos, los casetes del transgén del amplicón de GUS se obtuvieron como se describió antes para ensayar la expresión dirigida por las secuencias EXP, EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–CI.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) y EXP–CI.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97). La expresión se comparó con los controles EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV.35S–enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170). La Tabla 23 siguiente muestra los valores promedio de GUS y luciferasa determinados para cada amplicón. La Tabla 24 siguiente muestra las relaciones de expresión de GUS/RLuc y GUS/FLuc normalizada con respecto a la expresión dirigida en EXP–Os.Act1:1:9 y EXP–CaMV.35S–enh+Zm.DnaK:1:1 en protoplastos de maíz.

Tabla 23. Actividad promedio de GUS y luciferasa en las células protoplásticas de hoja de trigo transformadas.

Amplicón ID	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	RLuc	FLuc
PCR0145942	EXP–Os.Act1:1:9	179	478	46584,5	2709,75
PCR0145944	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	8178,5	43490,8	2927,25
PCR0145922	EXP–CI.Ubq1:1:10	98	22068,3	47662,3	1289
pMON146750	EXP–CI.Ubq1:1:16	93	34205	45064,5	1379,63
pMON146751	EXP–CI.Ubq1:1:17	97	31758	45739,3	2820,75

Tabla 24. Relaciones de GUS/RLuc y GUS/FLuc de expresión normalizada con respecto a EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) en protoplastos de hojas de trigo.

Amplicón ID	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/FLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/RLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	GUS/FLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1
PCR014594 2	EXP–Os.Act1:1:9	179	1,00	1,00	0,05	0,06
PCR014594 4	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	18,33	15,84	1,00	1,00
PCR014592 2	EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	45,12	97,05	2,46	6,13
pMON1467 50	EXP–Cl.Ubq1:1:16	93	73,97	140,55	4,04	8,87
pMON1467 51	EXP–Cl.Ubq1:1:17	97	67,67	63,82	3,69	4,03

Como se puede observar en la Tabla 24 anterior, las secuencias EXP EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) y EXP–Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) pudieron dirigir la expresión del transgén. La expresión dirigida por cada una de las secuencias EXP fue más alta que las de los controles.

En un cuarto conjunto de experimentos, los casetes del transgén del amplicón de GUS se obtuvieron como se describió antes para analizar la expresión dirigida por las secuencias EXP, EXP–Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) y EXP–Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108). La expresión se comparó con los controles EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163). La Tabla 25 siguiente muestra los valores promedio de GUS y luciferasa determinados para cada amplicón. La Tabla 26 siguiente muestra las relaciones de expresión de GUS/RLuc normalizada con respecto a expresión dirigida en EXP–Os.Act1:1:9 y EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 en los protoplastos de maíz.

Tabla 25. Actividad promedio de GUS y luciferasa en las células protoplásticas de hoja de trigo transformadas.

Plantilla	Amplicón ID	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	RLuc
pMON65328	PCR0145943	EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+O	163	67459,13	11682,00

		s.Act1:1:1			
pMON25455	PCR0145942	EXP–Os.Act1:1:9	179	56618,33	16654,83
pMON131962	pMON131962	EXP–Zm.UbqM1:1:11	149	53862,13	10313,75
pMON132047	pMON132047	EXP–Cl.Ubq1:1:23	108	38869,38	12279,00

Tabla 26. Relaciones de GUS/RLuc de expresión normalizada con respecto a EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163) en protoplastos de hojas de trigo.

Amplicón ID	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/RLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1
PCR0145943	EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	1,70	1,00
PCR0145942	EXP–Os.Act1:1:9	179	1,00	0,59
pMON131962	EXP–Zm.UbqM1:1:11	149	1,54	0,90
pMON132047	EXP–Cl.Ubq1:1:23	108	0,93	0,55

Como se puede observar en la Tabla 26 anterior, las secuencias EXP, EXP–Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) y EXP–Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108) pudieron dirigir la expresión de GUS en los protoplastos de hoja de trigo. La expresión fue similar a la del control, EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y más baja que el de EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163).

Ejemplo 5: Análisis de elementos regulatorios que dirigen GUS en los protoplastos de caña de azúcar usando amplicones del casete del transgén de GUS.

Los protoplastos de hoja de caña de azúcar se transformaron con amplicones de ADN derivados de los vectores de expresión de planta que contienen una secuencia EXP, que dirige la expresión del transgén de ß–glucuronidasa (GUS), y compararon con el protoplasto de hoja en que la expresión de GUA fue dirigida por promotores constitutivos conocidos.

Las células de protoplasto de caña de azúcar derivadas de tejido de hojas se transformaron usando un método de transformación a base de PEG, tal como se describió en el Ejemplo 3 anterior con amplicones producidos a partir de la amplificación de casetes transgénicos de GUS que comprenden vectores de expresión de plantas para comparar la expresión de un transgén (GUS) manejado por una de EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP–ERIra.Ubq1:1:10 (SEQ

000129

ID NO: 25), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–ERIra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP–ERIra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–CI.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–CI.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) y EXP–CI.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) y presentado en la siguiente Tabla 27, con aquel de promotores constitutivos conocidos.

Tabla 27. Amplicaciones de expresión en plantas de GUS y correspondiente plantilla de amplicón de constructo de plásmido y secuencia EXP.

Amplicón ID	Plantilla de amplicón	Secuencia EXP	SEQ ID NO:
PCR0145942	pMON25455	EXP–Os.Act1:1:9	179
PCR0145944	pMON81552	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170
PCR0145892	pMON136264	EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5
PCR0145815	pMON136264	EXP–ANDge.Ubq1:1:10	10
PCR0145893	pMON136259	EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12
PCR0145817	pMON136264	EXP–ANDge.Ubq1:1:11	14
PCR0145819	pMON136264	EXP–ANDge.Ubq1:1:12	16
PCR0145896	pMON136263	EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22
PCR0145820	pMON136263	EXP–ERIra.Ubq1:1:10	25
PCR0145897	pMON136258	EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27
PCR0145821	pMON136263	EXP–ERIra.Ubq1:1:11	29
PCR0145822	pMON136263	EXP–ERIra.Ubq1:1:12	31
PCR0145922	pMON140889	EXP–CI.Ubq1:1:10	98

PCR0145945	pMON140889	EXP–CI.Ubq1:1:13	114
PCR0145946	pMON140889	EXP–CI.Ubq1:1:14	115
PCR0145947	pMON140889	EXP–CI.Ubq1:1:15	116

Los amplicones del casete de GUS control y plásmidos de luciferasa usados para transformación del protoplasto de la caña de azúcar también fueron iguales a los presentados en los Ejemplos 2 a 4 y se proporcionar en la Tabla 7 anterior en el Ejemplo 3. Asimismo, se usaron controles negativos para la determinación de GUS y luciferasa umbral, como se describió antes. La Tabla 28 lista la actividad promedio de GUS y LUC observada en las las células protoplásticas de hoja transformadas de la caña de azúcar, y la Tabla 29 muestra las relaciones de expresión de GUS/RLuc normalizadas en protoplastos de hoja de caña de azúcar.

Tabla 28. Actividad promedio de GUS y luciferasa en las células protoplásticas de hoja de trigo transformadas.

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	RLuc	FLuc
EXP–Os.Act1:1:9	179	6667,5	3024,5	1129,25
EXP–CaMV.35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	14872,8	5171	2019,5
EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	15225	4618,25	1775,75
EXP–ANDge.Ubq1:1:10	10	17275,3	4333	1678
EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	17236	5633,25	2240

000151

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS	RLuc	FLuc
EXP–ANDge.Ubq1:1:11	14	22487,8	6898,25	2878
EXP–ANDge.Ubq1:1:12	16	22145,3	6240,25	2676,5
EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	16796,5	7759,75	3179
EXP–ERIra.Ubq1:1:10	25	16267,5	5632,75	2436,75
EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	25351	9019,5	4313,5
EXP–ERIra.Ubq1:1:11	29	16652,3	3672,25	1534
EXP–ERIra.Ubq1:1:12	31	12654,5	3256,75	1261,5
EXP–CI.Ubq1:1:10	98	22383,8	7097,5	3109,25
EXP–CI.Ubq1:1:13	114	14532,3	2786,5	1198,25
EXP–CI.Ubq1:1:14	115	19244,5	3455,25	1475
EXP–CI.Ubq1:1:15	116	6676,5	3870,25	1497,75

000152

Tabla 29. Relaciones de GUS/RLuc y GUS/FLuc de expresión normalizada con respecto a EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) en protoplastos de hojas de caña de azúcar.

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/FLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/RLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	GUS/FLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1
EXP–Os.Act1:1:9	179	1,00	1,00	0,77	0,80
EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	1,30	1,25	1,00	1,00
EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	1,50	1,45	1,15	1,16
EXP–ANDge.Ubq1:1:10	10	1,81	1,74	1,39	1,40
EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	1,39	1,30	1,06	1,04
EXP–ANDge.Ubq1:1:11	14	1,48	1,32	1,13	1,06
EXP–ANDge.Ubq1:1:12	16	1,61	1,40	1,23	1,12
EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	0,98	0,89	0,75	0,72
EXP–ERIra.Ubq1:1:10	25	1,31	1,13	1,00	0,91
EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	1,27	1,00	0,98	0,80

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	GUS/RLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/FLuc respecto de EXP–Os.Act1:1:9	GUS/RLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	GUS/FLuc respecto de EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1
EXP–ERIra.Ubq1:1:11	29	2,06	1,84	1,58	1,47
EXP–ERIra.Ubq1:1:12	31	1,76	1,70	1,35	1,36
EXP–CI.Ubq1:1:10	98	1,43	1,22	1,10	0,98
EXP–CI.Ubq1:1:13	114	2,37	2,05	1,81	1,65
EXP–CI.Ubq1:1:14	115	2,53	2,21	1,94	1,77
EXP–CI.Ubq1:1:15	116	0,78	0,75	0,60	0,61

Como puede verse en la Tabla 29 anterior, las secuencias EXP EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP–ERIra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–ERIra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP–ERIra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–CI.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–CI.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) y EXP–CI.Ubq1:1:15

(SEQ ID NO: 116) eran todas capaces de mover la expresión transgénica en protoplastos de caña de azúcar. Las secuencias EXP, EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP–ERIra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–ERIra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–CI.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114) y EXP–CI.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) expresaron GUS más que EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) en este experimento.

Ejemplo 6: Análisis de elementos de regulación que llevan CP4 en protoplastos de maíz

Este ejemplo ilustra la capacidad de EXP–Sv.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 128), EXP–Sv.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 132), EXP–Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133), EXP–Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), EXP–Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145), EXP–Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), EXP–SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), EXP–SETit.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 123), EXP–SETit.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 124), EXP–Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151) y EXP–Sb.Ubq6:1:2 (SEQ ID NO: 153) de llevar la expresión del gen de tolerancia a glifosato CP4 en protoplastos de maíz. Estas secuencias EXP se clonaron en constructos de plásmido por transformación binaria de planta usando métodos conocidos en la técnica. Los vectores de expresión de planta resultantes contenían una región del límite derecho de *A. tumefaciens*, una secuencia EXP de ubiquitina unida operativamente 5′ a una secuencia codificadora EPSPS tolerante a glifosato dirigida a plástido (CP4, US RE39247), unida operativamente 5′ a la UTR 3′ T–AGRtu.nos–1:1:13 y una

región del límite izquierdo de *A. tumefaciens* (B–AGRtu.límite izquierdo). Los constructos de plásmido resultantes se usaron para transformar células de protoplastos de hoja de maíz usando métodos conocidos en la técnica.

Se utilizaron constructos de plásmido listados en la Tabla 30, con las secuencias EXP que se definieron en la Tabla 1. Se construyeron tres plásmidos de control (pMON30098, pMON42410, y pMON30167), con elementos regulatorios constitutitos conocidos que dirigen CP4 o GFP, y se usaron para comparar los niveles de expresión de CP4 relativos dirigida por estas secuencias EXP con la expresión de CP4 dirigida por elementos de expresión constitutivos conocidos. También se usaron otros dos plásmidos (pMON19437 y pMON63934) que se describieron antes para evaluar la eficiencia y viabilidad de la transformación. Cada plásmido contiene una secuencia codificadora de luciferasa específica dirigida por una secuencia EXP constitutiva.

Los protoplastos de hoja de maíz se transformaron usando un método de transformación basado en PEG, que se describió en el anterior Ejemplo 2. Las mediciones de CP4 y luciferasa se realizaron de modo similar al anterior Ejemplo 2. Los niveles promedio de la expresión de proteína de CP4 expresados como parte por millón (ppm) se muestra en la siguiente Tabla 30.

Tabla 30. Expresión de proteína CP4 promedio en protoplastos de hoja de maíz.

Plásmido	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	CP4 medio ppm	CP4 STDEV ppm
No ADN	No ADN		0	0

Plásmido	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	CP4 medio ppm	CP4 STDEV ppm
pMON30098	GFP		0	0
pMON42410	EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	34,1	15,6
pMON30167	EXP–Os.Act1:1:1	164	40,4	11,6
pMON129203	EXP–Sv.Ubq1:1:7	128	45,2	6,2
pMON129204	EXP–Sv.Ubq1:1:8	132	101,9	13,8
pMON129205	EXP–Sv.Ubq1:1:9	133	71,1	8,7
pMON129210	EXP–Zm.UbqM1:1:6	137	137,1	14,8
pMON129211	EXP–Zm.UbqM1:1:8	145	136,5	12,3
pMON129212	EXP–Zm.UbqM1:1:7	141	170,2	18,1
pMON129200	EXP–SETit.Ubq1:1:5	117	44,3	9,5
pMON129201	EXP–SETit.Ubq1:1:7	123	105,1	8,4
pMON129202	EXP–SETit.Ubq1:1:6	124	124,9	33,7
pMON129219	EXP–Sb.Ubq4:1:2	151	14,3	1
pMON129218	EXP–Sb.Ubq6:1:2	153	75,7	8,9

Como se ve en la Tabla 30, EXP–Sv.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 128), EXP–Sv.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 132), EXP–Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133), EXP–Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), EXP–Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145), EXP–Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), EXP–SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), EXP–SETit.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 123), EXP–SETit.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 124) y EXP–Sb.Ubq6:1:2 (SEQ ID NO: 153) llevaron la expresión del

transgén CP4 a niveles cercanos o mayores que los niveles de expresión de CP4 llevados por EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 y EXP–Os.Act1:1:1. La secuencia EXP, EXP–Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151) demostró la capacidad de dirigir la expresión de CP4, pero el nivel de expresión fue menor que el de los controles constitutivos.

También se pueden obtener datos similares a los anteriores a partir de plantas transformadas en forma estable con constructos de plásmido descriptos anteriormente, por ejemplo, plantas de las generaciones de progenie R_0, R_1 o F_1 o posterior. Asimismo, se puede estudiar la expresión de otros constructos de plásmido. Por ejemplo, pMON141619, comprende la secuencia EXP EXP–ANDge.Ubq1:1:8, mientras que pMON142862 esta compuesta de la secuencia EXP EXP–ERIra.Ubq1:1:8. Estos y otros constructos se pueden analizar de esta manera.

Ejemplo 7: Análisis de elementos regulatorios que dirigen CP4 en protoplastos de maíz usando amplicones del casete de transgén de CP4.

Este ejemplo ilustra la capacidad de EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP–ERIra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–ERIra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP–ERIra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–CI.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–CI.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115), EXP–CI.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116), EXP–CI.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) y EXP–CI.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) de llevar la expresión del gen de

tolerancia a glifosato CP4 en protoplastos de maíz. Estas secuencias EXP se clonaron en constructos de plásmido para transformación binaria en plantas. Los vectores de expresión de planta resultantes se usaron como moldes de amplificación para producir un amplicón del casete del transgén compuesto de una secuencia de EXP de ubiquitina unida operativamente 5´ a una secuencia codificadora EPSPS tolerante a glifosato dirigida a plástido (CP4, US RE39247), unida operativamente 5´ a la UTR 3' de T–AGRtu.nos–1:1:13 y una región del límite izquierdo de *A. tumefaciens*. Los amplicones resultantes se usaron para transformar células de protoplastos de hoja de maíz.

Los protoplastos de hoja de maíz se transformaron usando un método de transformación basado en PEG, como se describió en el Ejemplo 2 anterior. Las mediciones de CP4 se realizaron usando un ensayo basado en ELISA. Los niveles promedio de expresión de la proteína CP4 expresados como parte por millón (ppm) se muestran en las siguientes Tablas 31 y 32.

En una primera serie de experimentos, la expresión de CP4 llevada por amplicones compuestos por las secuencias EXP EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP–ERIra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–ERIra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP–ERIra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–CI.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–CI.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) y EXP-CI.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) se ensayaron en protoplastos de hojas de maíz transformados y se compararon con los niveles de expresión

CC0159

de CP4 llevados por los controles constitutivos, EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) y EXP–Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). Los niveles promedio de la expresión de proteína CP4 expresados como parte por millón (ppm) se muestra en las siguientes Tablas 31.

Tabla 31. Expresión de proteína promedio de CP4 en protoplastos de hojas de maíz.

Plantilla de amplicón	Amplicón ID	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	CP4 ng/mg de proteína total promedio	CP4 ng/mg de proteína total STDEV
		no ADN		0,0	0,0
pMON30098		GFP (control negativo)		0,0	0,0
pMON19469	PCR24	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	605,5	27,6
pMON30167	PCR25	EXP–Os.Act1:1:1	164	50,6	14,2
pMON140896	PCR41	EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	459,0	60,9
pMON140917	PCR42	EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	258,2	38,4
pMON140897	PCR43	EXP–ANDge.Ubq1:1:10	10	324,8	21,6
pMON140898	PCR44	EXP–	12	394,9	66,4

		ANDge.Ubq1:1:6			
pMON140899	PCR45	EXP–ANDge.Ubq1:1:11	14	508,7	89,6
pMON140900	PCR46	EXP–ANDge.Ubq1:1:12	16	329,3	14,5
pMON140904	PCR50	EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	148,6	24,4
pMON140905	PCR51	EXP–ERIra.Ubq1:1:10	25	215,8	22,6
pMON140906	PCR52	EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	376,6	44,1
pMON140907	PCR53	EXP–ERIra.Ubq1:1:11	29	459,9	104,7
pMON140908	PCR54	EXP–ERIra.Ubq1:1:12	31	221,6	15,9
pMON140913	PCR19	EXP–CI.Ubq1:1:10	98	287,8	50,9
pMON140914	PCR20	EXP–CI.Ubq1:1:13	114	585,8	47,9
pMON140915	PCR21	EXP–CI.Ubq1:1:14	115	557,5	76,6
pMON140916	PCR22	EXP–CI.Ubq1:1:15	116	33,2	9,5

Como se puede ver en la anterior Tabla 31, las secuencias EXP EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP–ERIra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–ERIra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP–ERIra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31),

000161

EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) y EXP–Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) eran capaces de llevar la expresión de CP4. Todas las secuencias EXP con la excepción de una EXP–Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) dirigieron los niveles de expresión de CP4 a un nivel mucho más alto que el control constitutivo, EXP–Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). Los niveles de expresión fueron menores que los de EXP–CaMV.35S–enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170).

En una segunda serie de experimentos, la expresión de CP4 dirigida por los amplicones compuestos de las secuencias EXP EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) y EXP–Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) se analizó en los protoplastos de hoja de maíz transformados y se compararon con los niveles de expresión de CP4 dirigidos por el control constitutivo, EXP–Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). Los niveles promedio de expresión de la proteína CP4 expresados como parte por millón (ppm) se muestran en las siguientes Tablas 32.

Tabla 32. Expresión promedio de la proteína CP4 en protoplastos de hoja de maíz.

Plantilla de amplicón	Amplicón ID	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	CP4 de hoja de maíz mg/proteína total promedio	CP4 de hoja de maíz mg/ proteína total StdDev
pMON30167	PCR25	EXP–Os.Act1:1:1	164	12,2	1,69
pMON140913	PCR19	EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	307,5	24,21
pMON142748	pMON142748	EXP–Cl.Ubq1:1:16	93	245,95	30,14
pMON142749	pMON142749	EXP–Cl.Ubq1:1:17	97	302,85	25,32

Como se puede observar en la Tabla 32 anterior, las secuencias EXP EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) y EXP–Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) pudieron dirigir la expresión de CP4. Los niveles de expresión dirigidos por las tres secuencias EXP fueron mayores que los del control constitutivo, EXP–Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164).

Ejemplo 8: Análisis de elementos regulatorios que dirigen CP4 en protoplastos de trigo.

Este ejemplo ilustra la capacidad de EXP–Sv.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 128), EXP–Sv.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 132), EXP–Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO:

133), EXP–Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), EXP–Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145), EXP–Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), EXP–SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), EXP–SETit.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 123), EXP–SETit.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 124), EXP–Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151) y EXP–Sb.Ubq6:1:2 (SEQ ID NO: 153) para dirigir la expresión de CP4 en protoplastos de hojas de trigo. Estas secuencias EXP se clonaron en constructos de plásmido para transformación binaria en plantas usando métodos conocidos en la técnica, y como se describe en los Ejemplos 2 y 5 anteriores.

Tres plásmidos de control (pMON30098, pMON42410, como se describió previamente, y pMON43647 que comprende una región del límite derecho de *Agrobacterium tumefaciens* con EXP–Os.Act1+CaMV.35S.2xA1–B3+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 138) unida operativamente 5´ a una secuencia codificadora de tolerancia al glifosato dirigida al plástido (CP4, US RE39247), unida operativamente 5´ a T–AGRtu.nos–1:1:13, y una región del límite izquierdo (B–AGRtu.límite izquierdo) con elementos regulatorios constitutivos conocidos que dirigen CP4 o GFP se construyeron como se ilustra en el Ejemplo 5.

Los protoplastos de hoja de trigo se transformaron usando un método de transformación basado en PEG que se describió en los ejemplos previos con la excepción se usaron 1,5 X 10^5 células protoplásticas por ensayo. Los ensayos de expresión del transgén de luciferasa y CP4 se realizaron como se describió antes en el Ejemplo 6. Los niveles de expresión de CP4 promedio determinados por ELISA de CP4 se presentan en la siguiente Tabla 34.

Tabla 34. Expresión de proteína de CP4 promedio en células protoplásticas de hoja de trigo.

Plásmido	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	CP4 prom ppm	CP4 STDEV ppm
No ADN	No ADN		0	0
pMON30098	GFP		0	0
pMON43647	EXP–Os.Act1+CaMV,35S,2xA1–B3+Os.Act1:1:1	172	656,2	124,5
pMON42410	EXP–CaMV,35S–mej+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163	438,3	78,9
pMON30167	EXP–Os.Act1:1:1	164	583	107,4
pMON129203	EXP–Sv.Ubq1:1:7	128	156,9	25,1
pMON129204	EXP–Sv.Ubq1:1:8	132	39,5	7
pMON129205	EXP–Sv.Ubq1:1:9	133	154,5	56,5
pMON129210	EXP–Zm.UbqM1:1:6	137	1500	0
pMON129211	EXP–Zm.UbqM1:1:8	145	199,7	64,9
pMON129212	EXP–Zm.UbqM1:1:7	141	234,6	66,9
pMON129200	EXP–SETit.Ubq1:1:5	117	725,7	149,7
pMON129201	EXP–SETit.Ubq1:1:7	123	64,9	14,5
pMON129202	EXP–SETit.Ubq1:1:6	124	122,9	48,7
pMON129219	EXP–Sb.Ubq4:1:2	151	113,1	32,8

La cantidad total de expresión de CP4 en protoplastos de trigo dirigida por las secuencias EXP y la secuencia EXP constitutiva conocida EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 demostró diferentes niveles de expresión de CP4 en protoplastos de trigo cuando se comparó con los protoplastos de maíz.

Varias secuencias EXP dirigieron la expresión de CP4 en niveles más bajos en protoplastos de trigo las secuencias EXP constitutivas conocidas EXP–Os.Act1+CaMV.35S.2xA1–B3+Os.Act1:1:1 y EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1. Dos secuencias EXP, EXP–Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), y EXP–SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), proporcionan mayoes de niveles de expresión de CP4 en protoplastos de trigo que las secuencias EXP constitutivas conocidas en este ensayo. EXP–Zm.UbqM1:1:2 dirigió la expresión de CP4 en el nivel más alto, con niveles de expresión que son 2,2 a 3,4 veces más altos que EXP–Os.Act1+CaMV.35S.2xA1–B3+Os.Act1:1:1 y EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1, respectivamente. Todas la secuencias EXP analizadas demostraron la capacidad para dirigir la expresión de CP4 en las células de trigo.

Ejemplo 9: Análisis de elementos regulatorios que dirigen CP4 en protoplastos de trigo usando amplicones del casete del transgén de CP4.

Este ejemplo ilustra la capacidad de EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP–ERIra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–ERIra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO:

29), EXP–ERIra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–CI.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–CI.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115), EXP–CI.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116), EXP–CI.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) y EXP–CI.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) de dirigir la expresión del gen de tolerancia a glifosato CP4 en protoplastos de trigo. Estas secuencias EXP se clonaron en constructos de plásmido para transformación binaria en plantas. Los vectores de expresión de planta resultantes se usaron como moldes de amplificación para producir un amplicón del casete del transgén compuesto de una secuencia de EXP de ubiquitina unida operativamente 5´ a una secuencia codificadora EPSPS tolerante a glifosato dirigida a plástido (CP4, US RE39247), unida operativamente 5´ a la UTR 3' de T–AGRtu.nos–1:1:13 y una región del límite izquierdo de *A. tumefaciens*. Los amplicones resultantes se usaron para transformar células de protoplastos de hoja de maíz.

Los protoplastos de hoja de trigo se transformaron usando un método de transformación basado en PEG, como se describió en el Ejemplo 2 anterior. Las mediciones de CP4 se realizaron usando un ensayo basado en ELISA. Los niveles promedio de expresión de la proteína CP4 expresados como parte por millón (ppm) se muestran en las siguientes Tablas 35 y 36.

En una primera serie de experimentos, la expresión de CP4 dirigida por los amplicones compuestos por las secuencias EXP EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP–ERIra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–ERIra.Ubq1:1:11

(SEQ ID NO: 29), EXP–ERIra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–CI.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–CI.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) y EXP–CI.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) se ensayaron en protoplastos transformados de hojas de trigo y se compararon con los niveles de expresión de CP4 dirigidos por los controles constitutivos, EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) y EXP–Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). Los niveles promedio de la expresión de proteína CP4 expresado como parte por millón (ppm) se muestra en las siguientes Tablas 35.

Tabla 35. Expresión de proteína promedio CP4 en protoplastos de hojas de trigo.

Plantilla de amplicón	Amplicón ID	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	CP4 ng/mg de proteína total promedio	CP4 ng/mg de proteína total STDEV
		no ADN		0,00	0,00
pMON30098		GFP (control negativo)		0,00	0,00
pMON19469	PCR24	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	76,11	18,65
pMON30167	PCR25	EXP–Os.Act1:1:1	164	3,83	0,73
pMON140896	PCR41	EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	103,46	16,31
pMON140917	PCR42	EXP–	8	61,48	1,99

		ANDge.Ubq1:1:8			
pMON140897	PCR43	EXP–ANDge.Ubq1:1:10	10	62,65	4,58
pMON140898	PCR44	EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	48,74	3,09
pMON140899	PCR45	EXP–ANDge.Ubq1:1:11	14	54,91	3,50
pMON140900	PCR46	EXP–ANDge.Ubq1:1:12	16	42,81	5,97
pMON140904	PCR50	EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	31,26	1,69
pMON140905	PCR51	EXP–ERIra.Ubq1:1:10	25	49,82	5,96
pMON140906	PCR52	EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	37,43	4,52
pMON140907	PCR53	EXP–ERIra.Ubq1:1:11	29	27,17	0,96
pMON140908	PCR54	EXP–ERIra.Ubq1:1:12	31	17,41	4,13
pMON140913	PCR19	EXP–CI.Ubq1:1:10	98	66,66	13,45
pMON140914	PCR20	EXP–CI.Ubq1:1:13	114	79,42	10,74
pMON140915	PCR21	EXP–CI.Ubq1:1:14	115	75,53	9,32

pMON140916	PCR22	EXP–Cl.Ubq1:1:15	116	0,00	0,00

Tal como se puede ver en la Tabla 31 anterior, las secuencias EXP EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP–ERIra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–ERIra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP–ERIra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Cl.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–Cl.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) y EXP–Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) eran capaces de dirigir la expresión de CP4. Todas las secuencias EXP con la excepción de una EXP–Cl.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) dirigieron niveles de expresión de CP4 a un nivel mucho mayor que el control constitutivo, EXP–Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). Los niveles de expresión estuvieron alrededor del mismo nivel o más bajo que el de EXP–CaMV.35S–enh+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) para la mayor parte de las secuencias EXP.

En una segunda serie de experimentos, la expresión de CP4 dirigida por los amplicones compuestos de las secuencias EXP EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) y EXP–Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) se analizaron en los protoplastos de hoja de trigo transformados y se compararon con los niveles de expresión de CP4 dirigidos por el control constitutivo, EXP–Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). Los niveles promedio de

expresión de la proteína CP4 expresados como parte por millón (ppm) se muestran en las siguientes Tablas 32.

Tabla 36. Expresión promedio de la proteína CP4 en protoplastos de hoja de trigo.

Plantilla de amplicón	Amplicón ID	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	CP4 de hojas de maíz mg/de proteína total prom	CP4 de hojas de maíz mg/de proteína total StdDev
pMON30167	PCR25	EXP–Os.Act1:1:1	164	15,84	2,12
pMON140913	PCR19	EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	736,32	79,56
pMON142748	pMON142748	EXP–Cl.Ubq1:1:16	93	593,72	80,22
pMON142749	pMON142749	EXP–Cl.Ubq1:1:17	97	763,95	86,94

Tal como se puede ver en la Tabla 36 anterior, las secuencias EXP EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Cl.Ubq1:1:16 (SEQ ID NO: 93) y EXP–Cl.Ubq1:1:17 (SEQ ID NO: 97) eran capaces de dirigir la expresión de CP4. Los niveles de expresión dirigidos por las tres secuencias EXP eran superiores a los del control constitutivo, EXP–Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164).

Ejemplo 10: Análisis de elementos de regulación que dirigen CP4 en protoplastos de caña de azúcar.

Este ejemplo ilustra la capacidad de EXP–Sv.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 128), EXP–Sv.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 132), EXP–Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133), EXP–Zm.UbqM1:1:6 (SEQ ID NO: 137), EXP–Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145), EXP–Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), EXP–SETit.Ubq1:1:5 (SEQ ID NO: 117), EXP–SETit.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 123), EXP–SETit.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 124), EXP–Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151), EXP–Sb.Ubq6:1:2 (SEQ ID NO: 153) y EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98) para dirigir la expresión de CP4 en protoplastos de hojas de caña de azúcar. Las secuencias EXP se clonaron en constructos de plásmido para transformación binaria en plantas. Los vectores resultantes contenían una región del límite derecho de *Agrobacterium tumefaciens*, una secuencia de EXP de ubiquitina unida operativamente 5′ a una secuencia codificadora EPSPS tolerante a glifosato dirigida a plástido (CP4, US RE39247), unida operativamente 5′ a ña T–AGRtu.nos–1:1:13 (SEQ ID NO: 127) o T–CaMV.35S–1:1:1 (SEQ ID NO: 140) UTR 3' y una región del límite izquierdo de *A. tumefaciens* (B–AGRtu.left border). Los constructos de plásmido resultantes se usaron para transformar células de protoplastos de hoja de caña de azúcar usando el método de transformación con PEG.

Los constructos de plásmido pMON129203, pMON12904, pMON12905, pMON129210, pMON129211, pMON129212, pMON129200, pMON129201, pMON129202, pMON129219, y pMON129218 son como se describieron en la Tabla 12 anterior.

Se construyeron tres plásmidos de control (pMON30167 descripto anteriormente; pMON130803 que también comprende EXP–Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164); y pMON132804 que comprende EXP–P–CaMV.35S–enh–1:1:13/L–CaMV.35S–1:1:2/I–Os.Act1–1:1:19 (SEQ ID NO: 139), con elementos regulatorios constitutivos conocidos que dirigen CP4 y se usaron para comparar los niveles de expresión relativos de CP4 dirigidos por las secuencias EXP de ubiquitina listadas en la siguiente Tabla 37.

Los protoplastos de hoja de caña de azúcar se transformaron usando un método de transformación basado en PEG. Los niveles de expresión de CP4 promedio determinados por ELISA de CP4 se presentan en la siguiente Tabla 37.

Tabla 37. Expresión de proteína de CP4 promedio en células protoplásticas de hoja de la caña de azúcar.

			Experimento 1		Experimento 2	
Constructo de plásmido	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	CP4 prom ppm	CP4 STDEV ppm	CP4 prom ppm	CP4 STDEV ppm
pMON132804	EXP–P–CaMV,35S–enh–1:1:13/L–CaMV,35S–1:1:2/I–Os.Act1–1:1:19	173	557,97	194,05	283,63	95,8
pMON30167	EXP–Os.Act1:1:1	164	57,15	20,99	18,36	5,41
pMON130803	EXP–Os.Act1:1:1	164	34,26	1,61	16,57	3,71

pMON129203	EXP–Sv.Ubq1:1:7	128	89,2	32,46	56,86	9,55
pMON129204	EXP–Sv.Ubq1:1:8	132	87,2	45,87	98,46	12,93
pMON129205	EXP–Sv.Ubq1:1:9	133	263,57	70,14	72,53	9,25
pMON129210	EXP–Zm.UbqM1:1:6	137	353,08	29,16	199,31	41,7
pMON129211	EXP–Zm.UbqM1:1:8	145	748,18	15,1	411,24	17,12
pMON129212	EXP–Zm.UbqM1:1:7	141	454,88	75,77	215,06	23,22
pMON129200	EXP–SETit.Ubq1:1:5	117	150,74	63,21	91,71	41,35
pMON129201	EXP–SETit.Ubq1:1:7	123	119,57	58,1	102,72	31,12
pMON129202	EXP–SETit.Ubq1:1:6	124	43,79	25,77	97,63	46,07
pMON129219	EXP–Sb.Ubq4:1:2	151	95,63	38,69		
pMON129218	EXP–Sb.Ubq6:1:2	153	343,34	119,2	179,75	51,16
pMON129221	EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	374,8	205,28	258,93	38,03

Como se puede observar en la Tabla 37 above, las secuencias EXP demostraron la capacidad de dirigir la expresión de CP4 en los protoplastos de caña de azúcar. Los niveles de expresión fueron similares o mayores que los de la expresión de CP4 dirigida por EXP–Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). Una secuencia EXP, EXP–Zm.UbqM1:1:8 (SEQ ID NO: 145), demostró mayores niveles de expresión cuando se compararon con EXP–P–CaMV.35S–enh–

1:1:13/L–CaMV.35S–1:1:2/I–Os.Act1–1:1:19 (SEQ ID NO: 139) en los protoplastos de caña de azúcar.

Ejemplo 11: Análisis de elementos regulatorios que dirigen CP4 en los protoplastos de caña de azúcar usando amplicones del casete del transgén de CP4.

Este ejemplo ilustra la capacidad de EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP–ERIra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–ERIra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP–ERIra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–CI.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–CI.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) y EXP–CI.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) de dirigir la expresión del gen de tolerancia a glifosato CP4 en protoplastos de caña de azúcar. Estas secuencias EXP se clonaron en constructos de plásmido para transformación binaria en plantas. Los vectores de expresión de planta resultantes se usaron como moldes de amplificación para producir un amplicón del casete del transgén compuesto de una secuencia de EXP de ubiquitina unida operativamente 5′ a una secuencia codificadora EPSPS tolerante a glifosato dirigida a plástido (CP4, US RE39247), unida operativamente 5′ la UTR 3' de T–AGRtu.nos–1:1:13 y una región del límite izquierdo de *A. tumefaciens*. Los amplicones resultantes se usaron para transformar células de protoplastos de hoja de caña de azúcar.

Los protoplastos de hoja de caña de azúcar se transformaron usando un método de transformación basado en PEG, como se describió en el Ejemplo 2 anterior. Las mediciones de CP4 se realizaron usando un ensayo basado en ELISA.

La expresión de CP4 dirigida por amplicones compuestos por las secuencias EXP EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP–ERIra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–ERIra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP–ERIra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–CI.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114), EXP–CI.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) y EXP–CI.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) se ensayaron en protoplastos transformados de hojas de trigo y se compararon con niveles de expresión de CP4 dirigidos por controles constitutivos, EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO: 170) y EXP–Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 164). Los niveles promedio de la expresión de proteína CP4 expresados como parte por millón (ppm) se muestran en la siguiente Tabla 38

Tabla 38. Expresión de proteína promedio de CP4 en protoplastos de hojas de caña de azúcar.

Plantilla de amplicón	Amplicón ID	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	CP4 ng/mg de proteína total promedio	CP4 ng/mg de proteína total STDEV
pMON19469	PCR24	EXP–CaMV,35S–mej+Zm.DnaK:1:1	170	99,6	7,2
pMON30167	PCR25	EXP–Os.Act1:1:1	164	0,0	0,0
pMON140896	PCR41	EXP–ANDge.Ubq1:1:7	5	21,9	3,3
pMON140917	PCR42	EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	15,4	1,9
pMON140897	PCR43	EXP–ANDge.Ubq1:1:10	10	20,7	2,2
pMON140898	PCR44	EXP–ANDge.Ubq1:1:6	12	21,8	2,8
pMON140899	PCR45	EXP–ANDge.Ubq1:1:11	14	36,9	7,2
pMON140900	PCR46	EXP–ANDge.Ubq1:1:12	16	51,7	5,6
pMON140904	PCR50	EXP–ERIra.Ubq1:1:9	22	10,3	1,1
pMON140905	PCR51	EXP–	25	25,3	4,7

		ERIra.Ubq1:1:10			
pMON140906	PCR52	EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	29,9	4,6
pMON140907	PCR53	EXP–ERIra.Ubq1:1:11	29	44,0	7,1
pMON140908	PCR54	EXP–ERIra.Ubq1:1:12	31	37,0	5,4
pMON140913	PCR19	EXP–CI.Ubq1:1:10	98	19,2	1,3
pMON140914	PCR20	EXP–CI.Ubq1:1:13	114	20,5	2,1
pMON140915	PCR21	EXP–CI.Ubq1:1:14	115	23,2	1,6
pMON140916	PCR22	EXP–CI.Ubq1:1:15	116	0,0	0,0

Tal como se ve en la Tabla 38 anterior, las secuencias EXP EXP–ANDge.Ubq1:1:7 (SEQ ID NO: 5), EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–ANDge.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 10), EXP–ANDge.Ubq1:1:6 (SEQ ID NO: 12), EXP–ANDge.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 14), EXP–ANDge.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 16), EXP–ERIra.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 22), EXP–ERIra.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 25), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–ERIra.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 29), EXP–ERIra.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 31), EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–CI.Ubq1:1:13 (SEQ ID NO: 114) y EXP–CI.Ubq1:1:14 (SEQ ID NO: 115) eran capaces de dirigir la expresión de CP4. EXP–CI.Ubq1:1:15 (SEQ ID NO: 116) no parecieron expresar la expresión de CP4 en este ensayo.

Ejemplo 12: Análisis de elementos regulatorios que dirigen GUS en maíz transgénico

Las plantas de maíz se transformaron con vectores de expresión de planta que contienen las secuencias EXP que dirigen la expresión del transgén de ß–glucuronidasa (GUS), y las plantas resultantes se analizaron en cuanto a la expresión de proteína de GUS. Las secuencias EXP de ubiquitina se clonaron en constructos de plásmido para transformación binaria en plantas usando métodos conocidos en la técnica.

Los vectores de expresión de planta resultantes contienen una región del límite derecho de *A. tumefaciens*, un primer casete del transgén para analizar la secuencia EXP unida operativamente a una secuencia codificadora para ß–glucuronidasa (GUS) que posee el intrón procesable GUS–2, descripto antes, unido operativamente 5′ a la UTR 3' del gen de la proteína de transferencia de lípidos del arroz (T–Os.LTP–1:1:1, SEQ ID NO: 141); un segundo casete de selección del transgén usado para la selección de células de planta transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el promotor Actina 1 de arroz), y una región del límite izquierdo de *A. tumefaciens*. Los plásmidos resultantes se usaron para transformar las plantas de maíz. La Tabla 39 lista las denominaciones del plásmido, las secuencias EXP y las SEQ ID NOs, que también se describen en la Tabla 1.

Tabla 39. Plásmidos para transformación binaria en plantes y las secuencias EXP asociadas.

Constructo de plásmido	Secuencia EXP	SEQ ID NO:	Datos
pMON142865	EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	R_0 y R_1
pMON142864	EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	R_0 y R_1
pMON142729	EXP–Cl.Ubq1:1:12	90	R_0
pMON142730	EXP–Cl.Ubq1:1:11	95	R_0
pMON132047	EXP–Cl.Ubq1:1:23	108	R_0
pMON132037	EXP–SETit.Ubq1:1:10	119	R_0 y F_1
pMON131957	EXP–SETit.Ubq1:1:11	125	F1
pMON131958	EXP–Sv.Ubq1:1:11	130	R_0 y F_1
pMON131959	EXP–Sv.Ubq1:1:12	136	R_0
pMON131961	EXP–Zm.UbqM1:1:10	139	R_0
pMON131963	EXP–Zm.UbqM1:1:12	143	R_0
pMON131962	EXP–Zm.UbqM1:1:11	149	R_0
pMON132932	EXP–Sb.Ubq4:1:2	151	R_0
pMON132931	EXP–Sb.Ubq6:1:3	155	R_0
pMON132974	EXP–Sb.Ubq7:1:2	157	R_0 y F_1

Las plantas se transformaron usando transformaciones mediadas por *Agrobacterium*, por ejemplo como se describe en la Publicación de patente U.S. 20090138985.

Se usó el análisis histoquímica de GUS para el análisis de la expresión cualitativa de las plantas transformadas. Las secciones de tejido se incubaron con solución de tinción de GUS X–Gluc (5–bromo–4–cloro–3–indolil–b–glucurónido) (1 miligramo/mililitro) por una duración de tiempo apropiada, se lavaron y se inspeccionaron visualmente por la coloración azul. La actividad de GUS se determinó en forma cualitativa por inspección visual directa o inspección bajo un microscopio usando órganos y tejidos de planta seleccionados. Las plantas R_0 se inspeccionan por la expresión en las raíces y hojas así como la antera, estigma y semilla en desarrollo y embrión 21 días después de la polinización (21 DAP).

Para el análisis cuantitativo, se extrajo proteína total de tejidos seleccionados de plantas de maíz transformadas. Se usó un microgramo de proteína total con el sustrato fluorogénico, 4–metilumbeliferil–β–D–glucurónido (MUG) en un volumen de reacción total de 50 microlitros. El producto de reacción, 4–metilumbeliferona (4–MU), es máximamente fluorescente a pH alto, donde el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de una solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente. La fluorescencia se midió a una excitación de 365 nm, emisión de 445 nm usando un Fluoromax–3 (Horiba; Kyoto, Japón) con lector Micromax, con ajuste de ancho de ranura a excitación 2 nm y emisión 3 nm.

La expresión de R_0 promedio de GUS observada para cada transformación se presenta en las siguientes Tablas 40 y 41. El ensayo de GUS R_0 realizado en los transformantes transformados con pMON131957 (EXP–SETit.Ubq1:1:11, SEQ ID NO:125) no pasó los estándares de calidad. Estos transformantes se analizaron en una generación F1 y se presentan adicionalmente a continuación en este ejemplo.

Tabla 40. Expresión promedio R_0 de GUS en tejido de raíz y hojas.

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	V3 Raíz	V4 Raíz	V7 Raíz	VT Raíz	V3 Hoja	V4 Hoja	V7 Hoja	VT Hoja
EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	nd	255	199	70	nd	638	168	130
EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	nd	477	246	62	nd	888	305	242
EXP–Cl.Ubq1:1:12	90	nd	27	147	52	nd	75	189	199
EXP–Cl.Ubq1:1:11	95	nd	28	77	50	nd	101	177	223
EXP–Cl.Ubq1:1:23	108	0	nd	75	34	201	nd	194	200
EXP–SETit.Ubq1:1:10	119	0	nd	29	57	58	nd	37	46
EXP–Sv.Ubq1:1:11	130	nd	nd	nd	9	20	nd	55	29
EXP–	136	63	nd	0	28	184	nd	27	16

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	V3 Raíz	V4 Raíz	V7 Raíz	VT Raíz	V3 Hoja	V4 Hoja	V7 Hoja	VT Hoja
Sv.Ubq1:1:12									
EXP–Zm.UbqM1:1:10	139	0	nd	237	18	221	nd	272	272
EXP–Zm.UbqM1:1:12	143	0	nd	21	43	234	nd	231	196
EXP–Zm.UbqM1:1:11	149	124	nd	103	112	311	nd	369	297
EXP–Sb.Ubq4:1:2	151	125	nd	0	95	233	nd	150	88
EXP–Sb.Ubq6:1:3	155	154	nd	13	128	53	nd	39	55
EXP–Sb.Ubq7:1:2	157	37	nd	22	18	165	nd	89	177

Tabla 41. Expresión R_0 GUS promedio en expresión en órganos reproductivos de maíz (anteras, seda) y semillas en desarrollo (embriones y endosperma).

Secuencia EXP	SEQ ID NO:	VT Antera	VT/R1 Seda	21 DAP Embrión	21 DAP Endosperma
EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	247	256	24	54
EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	246	237	36	61

EXP–Cl.Ubq1:1:12	90	420	121	26	220
EXP–Cl.Ubq1:1:11	95	326	227	41	221
EXP–Cl.Ubq1:1:23	108	598	416	212	234
EXP–SETit.Ubc1:1:10	119	132	85	50	63
EXP–Sv.Ubq1:1:11	130	217	3	45	92
EXP–Sv.Ubq1:1:12	136	120	21	49	112
EXP–Zm.UbqM1:1:10	139	261	506	403	376
EXP–Zm.UbqM1:1:12	143	775	362	253	247
EXP–Zm.UbqM1:1:11	149	551	452	234	302
EXP–Sb.Ubq4:1:2	151	213	0	25	79
EXP–Sb.Ubq6:1:3	155	295	87	51	61
EXP–Sb.Ubq7:1:2	157	423	229	274	90

En las plantas de maíz R_0, los niveles de expresión de GUS en la hoja y raíz difirieron entre las secuencias EXP de ubiquitina. Si bien todas las secuencias EXP demostraron la capacidad de dirigir la expresión del transgén de GUS en plantas transformadas en forma estable, cada secuencia EXP demostró un patrón único de expresión respecto de los otros. Por ejemplo, se observaron niveles altos de expresión de GUS en las etapas tempranas del desarrollo de la raíz (V4 y V7) para EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) y EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) y declinaron en la etapa VT. La expresión en raíz dirigida por EXP–Zm.UbqM1:1:10 (SEQ ID NO: 139) no demostró expresión en V3 pero fue alta en V7 y luego descendió en la etapa VT. La expresión en raíz dirigida por EXP–Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149) se mantuvo en nivel similar a lo largo del desarrollo de las etapas V3, V7 a VT.

La expresión en raíz se observó desde el desarrollo temprano (V3/V4) a la etapa V7 y luego desciende de la etapa V7 a V8 en plantas transformadas con EXP–Cl.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 90), EXP–Cl.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 95) y EXP–Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108). Los niveles de expresión de GUS también mostraron diferencias drásticas en el tejido foliar. Los niveles más altos de expresión en hojas fueron conferidos en el desarrollo temprano (V3/V4) con EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) y EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) que declinan en la etapa V7 a VT. La expresión de GUS se retiene de la etapa V3 a VT usando EXP–Zm.UbqM1:1:10 (SEQ ID NO: 139), EXP–Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149), EXP–Zm.UbqM1:1:12 (SEQ ID NO: 143) y EXP–Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108); y en menor medida usando EXP–SETit.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 119) y EXP–Sb.Ubq6:1:3 (SEQ ID NO: 155). La expresión en la hoja aumentó de la etapa V3 a V7 a VT usando EXP–Cl.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 90), EXP–Cl.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 95) y EXP–Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108) mientras que la expresión declinó de la etapa V3 a VT usando EXP–Sv.Ubq1:1:12 (SEQ ID NO: 136) y EXP–Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151).

De manera similar, con respecto al tejido reproductivo (anteras y estigmas) y las semillas en desarrollo (embrión 21DAP y endosperma) se observaron diferentes patrones de expresión únicas para cada secuencia de EXP. Por ejemplo, se observaron elevados niveles de expresión en anteras y estigmas así como también en las semillas en desarrollo, para lo cual se utilizaron EXP–Zm.UbqM1:1:10 (SEQ ID NO: 139), EXP–Zm.UbqM1:1:11 (SEQ ID NO: 149), EXP–Zm.UbqM1:1:12 (SEQ ID NO: 143) y EXP–Cl.Ubq1:1:23 (SEQ ID NO: 108). La expresión fue elevada en las anteras y estigmas pero

baja en las semillas en desarrollo mediante EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) y EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27). La expresión impulsada por (SEQ ID NO: 157) fue elevada en el tejido reproductivo y elevada en los embriones en desarrollo pero más reducida en los endosperma en desarrollo. La secuencia de EXP, EXP–Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151) solamente demostró una expresión en las anteras pero no en las estigmas y se expresó mucho menos en las semillas en desarrollo. El EXP–Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130) demostró un patrón similar al del EXP–Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151) con respecto al tejido reproductivo y a las semillas en desarrollo, pero mientras que el EXP–Sb.Ubq4:1:2 (SEQ ID NO: 151) mostró una expresión en los tejidos de raíces y hojas, el EXP–Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130) se expresó mucho menos en estos mismos tejidos.

Los transformantes de generación R_0, seleccionados para inserciones de copias simples fueron cruzados con una cepa LH244 no transgénica (resultando en F_1) o fueron autopolinizados (resultando en R_1) a efectos de producir una población de semillas F_1 o R_1. En cualquier caso, para el estudio se seleccionaron plantas heterocigotas F_1 o R_1. Se midieron los niveles de expresión de GUS en tejidos seleccionados durante el trascurso de desarrollo, como descrito anteriormente. Los tejidos F_1 o R_1 utilizados para este estudio incluían: embrión de semilla embebido, endosperma de embrión embebido, raíz y coleóptido a los 4 días después de la germinación (DAG); hoja y raíz en la etapa V3; raíz y hoja madura en la etapa V8; raíz, hojas maduras, etapa VT (en el borlado, antes de la reproducción) anteras, polen, hoja y hoja senescentes; mazorca R1, estigmas, raíz e entrenudo; grano a los 12 días después de la polinización (DAP); y embrión y endosperma 21 y 38 DAP. Las muestras de

tejido seleccionadas también fueron analizadas para plantas F_1 expuestas a condiciones de sequía y estrés por frío para transformantes que comprendían pMON132037 (EXP–SETit.Ubq1:1:10, SEQ ID NO: 119), pMON131957 (EXP–SETit.Ubq1:1:11, SEQ ID NO: 125), pMON131958 (EXP–Sv.Ubq1:1:11, SEQ ID NO: 130) y pMON132974 (EXP–Sb.Ubq7:1:2, SEQ ID NO: 157). Los tejidos de raíz y hoja V3 fueron muestreadas después de su exposición a frío y sequía.

Se indujo estrés por sequía en plantas F_1, V3 transformadas con pMON132037 (EXP–SETit.Ubq1:1:10, SEQ ID NO: 119), pMON131957 (EXP–SETit.Ubq1:1:11, SEQ ID NO: 125), pMON131958 (EXP–Sv.Ubq1:1:11, SEQ ID NO: 130) y pMON132974 (EXP–Sb.Ubq7:1:2, SEQ ID NO: 157) para lo cual se retuvo agua durante 4 días y se permitió que el contenido de agua se redujera en por lo menos 50% del contenido original de agua de la planta completamente aguada. El protocolo de sequía consistía esencialmente en los pasos siguientes: a las plantas en etapa V3 se les deprivó en agua. A medida que una planta de maíz experimenta sequía, la forma de la hoja cambiará de un aspecto usual y desplegado saludable a una hoja que muestra un plegado en el haz vascular a medio nervio y adquirirá una forma de V si se observa desde la punta de la hoja hacia el tallo. Este cambio en la morfología usualmente empezó a tener lugar a los 2 días después del cese del aguado y en experimentos anteriores se demostró que estaba relacionado con una pérdida de agua de aproximadamente el 50% medida por peso de las macetas a cesación del aguado y el peso de los potes cuando se observó la morfología de hoja enrolladas en las plantas no aguadas. Las plantas fueron observadas bajo condiciones de sequía, cuando las hojas mostraron marchitamiento como se evidencia por un enrulado hacia dentro (forma de V) de la hoja. Se

considera que este nivel de estrés es una forma de estrés subletal. Una vez que cada planta demostró una inducción de sequía, definida anteriormente, la planta fue destruida para obtener muestras tanto de raíz como de hojas.

Además de sequía, unas plantas en etapa F_1 V3 transformadas con pMON132037 (EXP–SETit.Ubq1:1:10, SEQ ID NO: 119), pMON131957 (EXP–SETit.Ubq1:1:11, SEQ ID NO: 125), pMON131958 (EXP–Sv.Ubq1:1:11, SEQ ID NO: 130) y pMON132974 (EXP–Sb.Ubq7:1:2, SEQ ID NO: 157) también fueron expuestas a condiciones de frío para determinar si los elementos reguladores demostraban una expresión de GUS inducida por el frío. Se ensayaron plantas enteras para observar la inducción de la expresión de GUIS bajo estrés de frío en la etapa V3. Unas plantas de maíz en la etapa V3 fueron expuestas a una temperatura de 12°C en una cámara de frío durante 24 horas. Las plantas en la cámara de frío fueron cultivadas bajo una fuente de luz blanca de 800 micromoles por metro cuadrado por segundo con un ciclo de luz de diez horas de luz blanca y catorce horas de oscuridad. Después de su exposición al frío, se tomaron muestras de tejidos de hojas y raíces para establecer la expresión cuantitativa de GUS.

Se midió la expresión de GUS como arriba descrito. La expresión promedia de F_1 GUS determinada para cada muestra de tejido se presenta en las siguientes Tablas 42 y 43.

Tabla 42. Expresión promedia de F_1 GUS en plantas transformadas con pMON142864 y pMON142865.

Órgano	pMON142864	pMON142865
Hoja V3	86	74
raíz V3	41	52

Hoja V8	109	123
raíz V8	241	252
Flor y anteras VT	168	208
Hoja VT	158	104
Mazorca R1	171	224
Estigmas R1	314	274
Raíz R1	721	308
Entrenudo R1	428	364
Semilla R2 – 12DAP	109	72
Semilla R3–Embrión–21DAP	45	32
Semilla R3 – 21DAP–Endosperma	175	196
SEMILLA R5–38DAP–Embrión	163	58
Semilla 38DAP–Endosperma	90	69

000189

Tabla 43. Expresión promedia de F_1 GUS en plantas transformadas con pMON132037, pMON131957, pMON131958 y pMON132974.

Órgano	pMON132037	pMON131957	pMON131958	pMON132974
Embrión de semilla embebida	536	285	288	1190
Endosperma de semilla embebida	95	71	73	316
Coleoptilo–4 DAG	218	60	143	136
Raíz–4 DAG	74	33	101	48
Hoja V3	104	120	66	52
Raíz V3	74	71	81	194
Hoja V3–frío	73	15	72	N/A
raíz V3–frío	113	44	89	49
Hija V3–sequía	97	344	103	157
V3 Raíz–sequía	205	153	129	236
Hoja V8	185	142	77	282
raíz V8	33	16	61	28
Flor VT – anteras	968	625	619	888
Hoja VT	138	89	132	268

Hoja VT–senescente	121	100	156	345
Polen VT	610	1119	332	4249
Mazorca R1	291	70	168	127
Estigmas R1	164	124	167	101
Raíz R1	36	39	39	21
Entrenudo R1	255	89	232	141
Semilla R2 – 12DAP	138	170	165	169
Semilla R3–21 DAP–Embrión	94	97	489	389
Semilla R3 – 21 DAP– Endosperma	57	118	52	217
Semilla R5 – 38 DAP– Embrión	600	147	377	527
Semilla R5 – 38 DAP– Endosperma	58	36	57	106

En las plantas de maíz F_1, los niveles de expresión de GUS en los diversos tejidos muestreados diferían entre las secuencias EXP de ubiquitina. Si bien la totalidad de las secuencias de EXP demostraron la capacidad para impulsar la expresión del transgén de GUS en plantas de maíz F_1 establemente

transformadas, cada secuencia de EXP demostró un patrón único de expresión con respecto a las otras. Por ejemplo, la expresión de raíz R_1 es de aproximadamente el doble que para EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) y para EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8). La expresión de GUS en el embrión de semilla en desarrollo a 38 DAP es de aproximadamente el triple que para EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) y que para EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8). En cambio, la expresión de hojas y raíces en la etapa V3 y V8 es de aproximadamente la misma para EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) y EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8).

La expresión de F_1 GUS en las semillas embebidas (tejidos de embrión y endosperma) fue mucho más elevada en las plantas transformadas con EXP–Sb.Ubq7:1:2 (SEQ ID NO: 157) que en aquellas transformadas con EXP–SETit.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 119), EXP–SETit.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 125) y EXP–Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130). La sequía causó un incremento en la expresión de raíz V3 en las plantas transformadas con EXP–SETit.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 119), EXP–SETit.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 125), EXP–Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130) y EXP–Sb.Ubq7:1:2 (SEQ ID NO: 157), pero solamente incrementó la expresión en las hojas en las plantas transformadas con EXP–SETit.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 125), EXP–Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130) y EXP–Sb.Ubq7:1:2 (SEQ ID NO: 157). La expresión de V3 reforzada por la sequía fue la mayor mediante el uso de EXP–SETit.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 125). La expresión en el polen también fue mucho más elevada en las plantas transformadas con EXP–Sb.Ubq7:1:2 (SEQ ID NO: 157) que en aquellas transformadas con EXP–SETit.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 119), EXP–SETit.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 125) y EXP–Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130). La

expresión en el entrenudo R1 fue la mayor con EXP–SETit.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 119) y EXP–Sv.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 130) y la menor en las plantas transformadas con la EXP–SETit.Ubq1:1:11 (SEQ ID NO: 125).

Cada secuencia de EXP demostró la capacidad de impulsar la expresión del transgén en las plantas de maíz establemente transformadas. Sin embargo, cada secuencia de EDP tenía un patrón de expresión para cada tejido que era único y ofrece una oportunidad para seleccionar la secuencia de EXP que mejor provee la expresión de un transgén específico en función de la estrategia para la expresión en el tejido para lograr los resultados deseados. Este ejemplo demuestra que las secuencias de EXP aisladas a partir de genes homólogos no se comportan necesariamente de manera equivalente en la planta transformada y que la expresión puede determinarse solamente mediante investigación empírica de las propiedades para cada secuencia de EXP y no pueden predecirse en base a la homología de los genes a partir del cual se derivó el promotor.

Ejemplo 13: Análisis de los elementos reguladores que impulsan el CP4 en el maíz transgénico

Unas plantas de maíz fueron transformadas con vectores de expresión de plantas que contienen secuencias de EXP que impulsan la expresión del transgén CP4, y las plantas resultantes fueron analizadas para determinar la expresión de la proteína CP4.

Las secuencias de EXP –ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133) y EXP–Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141) fueron clonadas en forma de constructos plásmidos de transformación binarias

de plantas. Los vectores resultantes contenían una región de borde derecho de *Agrobacterium tumefaciens*, una secuencia de EXP ubiquitina operablemente ligada 5′ a una secuencia codificadora EPSPS tolerante a glifosato apuntada a plástido (CP4, US RE39247), operablemente ligado 5′ a los T–AGRtu.nos–1:1:13 (SEQ ID NO: 127) 3′ UTR y una región de borde izquierda de *A. tumefaciens*. La siguiente Tabla 44 muestra los constructos plásmidos utilizados para el maíz y las secuencias de EXP correspondientes.

Tabla 44. Constructos plásmidos CP4 y correspondientes secuencias de EXP utilizadas para transformar maíz.

Constructo plásmido	Secuencia de EXP	SEQ ID NO:	Datos
pMON141619	EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	R_0 y F_1
pMON142862	EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	R_0 y F_1
pMON129221	EXP–CI.Ubq1:1:10	98	R_0 y F_1
pMON129205	EXP–Sv.Ubq1:1:9	133	R_0 y F_1
pMON129212	EXP–Zm.UbqM1:1:7	141	R_0

Las plantas resultantes fueron utilizadas para transformar plantas de maíz. Las plantas transformadas fueron seleccionadas en función de una o dos copias del T–ADN insertado y cultivadas en el invernadero. Se tomaron muestras de tejidos seleccionados en etapas específicas del desarrollo, y se midieron los niveles de proteína en dichos tejidos para lo cual se utilizó un ensayo CP4 ELISA. La expresión promedia de CP4 observada para cada

transformación se presenta en las siguientes Tablas 45 y 46, y gráficamente en la Figura 7.

Tabla 45. Expresión promedia de CP4 de hojas y raíces en plantas de maíz transformadas R_0

Secuencia de EXP	SEQ ID NO:	Hoja V4	Hoja V7	Hoja VT	raíz V4	raíz V7	raíz VT
EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	20.90	18.53	25.49	11.50	26.54	17.20
EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	19.92	16.60	25.58	9.92	26.31	13.33
EXP–CI.Ubq1:1:10	98	10.70	12.49	17.42	7.56	13.95	6.68
EXP–Sv.Ubq1:1:9	133	3.72	4.34	4.48	2.90	6.99	2.78
EXP–Zm.UbqM1:1:7	141	13.42	21.89	38.78	9.56	16.69	11.15

5

Tabla 46. Expresión promedia de CP4 en tejido reproductivo y semilla en desarrollo en plantas de maíz transformadas R_0.

Secuencia de EXP	SEQ ID NO:	Borla VT	Estigmas R1	Embrión R3	Endosperma R3
EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	24.14	5.55	7.29	4.91

EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	19.20	10.27	12.60	4.70
EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	18.70	16.21	8.26	8.82
EXP–Sv.Ubq1:1:9	133	7.10	4.72	3.13	1.74
EXP–Zm.UbqM1:1:7	141	67.25	11.21	7.85	10.69

Como puede verse en las Tablas 45 y 46, cada una de las secuencia de EXPs EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133) y EXP–Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141) fue capaz de impulsar la expresión de CP4 en todos los tejidos muestreados de las plantas transformadas R_0. Una expresión más elevada de CP4 en las raíces y hojas de transformantes que comprendían EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) y EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) que impulsa CP4 en mayor grado que EXP–Cl.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98) que impulsa CP4, puede estar relacionada con el nivel de tolerancia vegetativa a la aplicación de glifosato, como se observó para dichas poblaciones de transformantes (véase el siguiente 14).

Cada secuencia de EXP presentó un único patrón de expresión con respecto al nivel de expresión para cada tejido muestrado. Por ejemplo, si bien la expresión de CP4 en hojas, raíces y borla fueron similares para la secuencia de EXPs, EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) y EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), la expresión en las estigmas mediante utilizó EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) fue la mitad de la expresión impulsado por ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 21). Esto podría ser ventajoso para la expresión de transgenes en los que se desea una expresión constitutiva pero se preferiría menos expresión en el tejido de los estigmas. Las secuencias de EXPs

000196

demuestran patrones únicos de la expresión constitutiva de CP4 en plantas de maíz transformadas R_0.

Las plantas de maíz transformadas R_0 fueron cruzadas con una variedad LH244 no transgénica a efectos de producir semillas F_1. Las semillas de generación F_1 resultantes fueron analizadas para establecer la segregación del casete del transgén, y unas plantas heterocigotas para el casete de CP4 fueron seleccionadas para el análisis de la expresión de CP4. Se cultivaron las semillas en el invernadero y se produjeron dos grupos de plantas; uno de los grupos fue rociado con glifosato y el otro no fue rociado. La expresión de CP4 fue analizada en tejidos seleccionados mediante un ensayo estándar basado en ELISA. La expresión promedia de CP4 se muestra en las siguientes Tablas 47 y 48.

Tabla 47. Expresión promedia de CP4 en plantas de maíz transformadas F_1.

Órgano	pMON141619	pMON142862	pMON129221
Hoja V4	11.50	13.51	7.68
Raíz V4	12.48	12.60	10.29
Hoja V7	16.59	20.21	12.01
Raíz V7	11.00	13.62	8.15
Hoja VT	39.88	44.85	29.42
Raíz VT	17.43	21.83	13.43
Flor VT, anteras	52.74	55.72	53.62
R1 Estigmas	16.01	23.81	14.42
Semilla R321 DAP– Embrión	33.29	57.96	51.64

Semilla R3 –21 DAP– Endosperma	2.99	3.20	6.44

Como puede verse en la Tabla 47 arriba, la expresión de CP4 en hojas y raíces fue más elevada en los transformantes F_1 transformados con pMON141619 (EXP–ANDge.Ubq1:1:8, SEQ ID NO: 5) y pMON142862 (EXP–ERIra.Ubq1:1:8, SEQ ID NO: 27) que en aquellos transformados con pMON129221 (EXP–CI.Ubq1:1:10, SEQ ID NO: 98). La expresión en el tejido de anteras fue similar para las tres secuencias de EXPs si bien la expresión en los estigmas fue la más elevada con EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27). La expresión en el embrión en desarrollo (21 DAP) fue la más elevada en los transformantes que comprendían EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) y EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98) que impulsa CP4. La expresión en el endosperma en desarrollo fue más elevada en los transformantes que comprendían EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98) que impulsa CP4.

Tabla 48. Expresión promedia de CP4 en plantas de maíz transformadas F_1.

Órgano	pMON129205
Hoja V4	1.73
Raíz V4	2.44
Hoja V7	2.84
Hoja V7	1.51
Hoja VT	3.29
Raíz VT	2.63
Flor VT, anteras	7.52
Estigmas R1	1.99

R3 Semillas–21 DAP–Embrión	3.40
R3 Semillas–21 DAP–Endosperma	1.79

Como puede verse en las Tablas 47–48 arriba, la expresión de CP4 era mas baja en la totalidad de los tejidos de los transformantes F_1 transformados con pMON129205 (EXP–Sv.Ubq1:1:9, SEQ ID NO: 133) que en aquellos transformados con pMON141619 (EXP–ANDge.Ubq1:1:8, SEQ ID NO: 8), pMON142862 (EXP–ERIra.Ubq1:1:8, SEQ ID NO: 27) y pMON129221 (EXP–CI.Ubq1:1:10, SEQ ID NO: 98).

Los patrones de expresión únicos conferidos por cada una de las secuencias de EXP ensayadas, proveen una oportunidad de producir una planta transgénica en la cual la expresión puede ser objeto de una sintonía fina para realizar pequeños ajustes en la expresión del transgén en vista a una performance o efectividad máximas. Además, el testeo empírico de estas secuencias de EXP que impulsan diferentes expresión de transgén puede producir resultados en los que una secuencia de EXP en particular es muy adecuada para la expresión de un transgén específico o de una clase de transgenes en particular, aún si se descubre que otra secuencia de EXP resulte ser mejor para un transgén diferente o para una clase diferente de transgenes.

Ejemplo 14: Análisis de la tolerancia vegetativa al glifosato en las plantas de maíz transgénicas R_0.

Unas plantas de maíz fueron transformadas con vectores para la expresión en plantas que contenían secuencia de EXPs que impulsan la expresión del Transgén CP4, y las plantas resultantes fueron evaluadas para

establecer la tolerancia vegetativa y reproductiva frente a la aplicación de glifosato.

Unas plantas de maíz transformadas F_1 descritas en el Ejemplo 13 anterior transformadas con pMON141619, pMON142862, pMON129221, pMON129205 y pMON129212 y que comprendían las secuencias de EXP EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27), EXP–Cl.Ubq1:1.10 (SEQ ID NO: 98), EXP–Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133) y EXP–Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141), respectivamente, que impulsan CP4, fueron evaluadas para establecer su tolerancia tanto vegetativa como reproductiva cuando se las rocía con glifosato. Diez plantas F_1 para cada acontecimiento fueron divididas en dos grupos; el primer grupo consistía en cinco plantas que recibieron un rociado con glifosato y en la etapa de desarrollo V4 y V8; y un segundo grupo de cinco plantas que quedaron sin rociar (*es decir, de* control). Se aplicó glifosato mediante aplicación de spray foliar difundida con Roundup WeatherMax® con un coeficiente de aplicación de 1,5 a.e./acre (a.e. = equivalente a ácido). Después de siete a diez días, las hojas de cada planta fueron evaluadas para establecer el daño. Se evaluó la tolerancia vegetativa (Tolerancia vegetativa en la Tabla 49), para lo cual se compararon las plantas no rociadas y rociadas para cada acontecimiento y se utilizó una escala para evaluar los daños de manera de obtener un coeficiente final para la tolerancia vegetativa (T = tolerante, NT = no tolerante). Además, se ensayaron semillas para todas las plantas en cada acontecimiento. Se compararon las medidas de semillas entre plantas de control y plantas rociadas, y se dio una asignación de tolerancia reproductiva (Repro Tol en la Tabla 49) para cada acontecimiento en base a porcentaje de semillas de

plantas rociadas con respecto a los controles (T = tolerante, NT = no tolerante). La siguiente Tabla 49 muestra los coeficientes de tolerancia vegetativa y reproductiva para cada acontecimiento rociado en las etapas V4 y V8. La letra "T" = tolerante y "NT" indica no tolerante.

Tabla 49. Coeficientes de daño en las hojas, de acontecimientos de maíz transformados individual es en las etapas V4 y V8.

Constructo plásmido	Secuencia en EXP	SEQ ID NO:	acontecimiento	Veg Tol V4	Veg Tol V8	Repro Tol
pMON141619	EXP–ANDge.Ubq1:1:8	8	Acontecimiento 1	T	T	NT
			Acontecimiento 2	T	T	T
			Acontecimiento 3	T	T	NT
			Acontecimiento 4	T	T	NT
			Acontecimiento 5	T	T	T
			Acontecimiento 6	T	T	NT
			Acontecimiento 7	T	T	T
			Acontecimiento	T	T	T

Constructo plásmido	Secuencia en EXP	SEQ ID NO:	acontecimiento	Veg Tol V4	Veg Tol V8	Repro Tol
			8			
			Acontecimiento 9	T	T	NT
pMON142862	EXP–ERIra.Ubq1:1:8	27	Acontecimiento 1	T	T	T
			Acontecimiento 2	T	T	NT
			Acontecimiento 3	T	T	T
			Acontecimiento 4	T	T	T
			Acontecimiento 5	T	T	NT
			Acontecimiento 6	T	T	T
			Acontecimiento 7	T	T	NT
			Acontecimiento 8	T	T	T
			Acontecimiento 9	T	T	T

Constructo plásmido	Secuencia en EXP	SEQ ID NO:	acontecimiento	Veg Tol V4	Veg Tol V8	Repro Tol
pMON129221	EXP–Cl.Ubq1:1:10	98	Acontecimiento 1	T	T	NT
			Acontecimiento 2	T	T	NT
			Acontecimiento 3	NT	NT	T
			Acontecimiento 4	NT	NT	T
			Acontecimiento 5	T	T	NT
			Acontecimiento 6	NT	NT	T
			Acontecimiento 7	T	T	T
pMON129205	EXP–Sv.Ubq1:1:9	133	Acontecimiento 1	NT	NT	
			Acontecimiento 2	NT	NT	NT
			Acontecimiento 3	T	T	NT
			Acontecimiento	NT	NT	

Constructo plásmido	Secuencia en EXP	SEQ ID NO:	acontecimiento	Veg Tol V4	Veg Tol V8	Repro Tol
			4			
			Acontecimiento 5	NT	NT	NT
			Acontecimiento 6	NT	NT	NT
			Acontecimiento 7	NT	NT	NT
pMON129212	EXP–Zm.UbqM1:1:7	141	Acontecimiento 1	T	T	
			Acontecimiento 2	T	T	
			Acontecimiento 3	T	T	
			Acontecimiento 4	T	T	
			Acontecimiento 5	T	T	
			Acontecimiento 6	T	T	
			Acontecimiento 7	T	T	

Constructo plásmido	Secuencia en EXP	SEQ ID NO:	acontecimiento	Veg Tol V4	Veg Tol V8	Repro Tol
			Acontecimiento 8	T	T	
			Acontecimiento 9	T	T	
			Acontecimiento 10	T	T	

En base a la Tabla 49 precedente, todos los acontecimientos transformados ensayados que comprendían casetes de Transgén CP4 que comprendían las secuencias de EXP EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8), EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) y EXP–Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141) demostraron tener una tolerancia vegetativa completa en base a coeficientes de daños que no superaron un puntaje de diez. Cuatro acontecimientos de un total de nueve que comprendían EXP–ANDge.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 8) y seis acontecimientos de un total de nueve que comprendían EXP–ERIra.Ubq1:1:8 (SEQ ID NO: 27) eran tolerantes tanto vegetativa como reproductivamente a la aplicación de glifosato. En cambio, los acontecimientos que comprendían EXP–CI.Ubq1:1:10 (SEQ ID NO: 98) eran sea vegetativamente tolerantes sea reproductivamente tolerantes pero no ambas cosas a la vez. Solamente un acontecimiento que comprendía EXP–Sv.Ubq1:1:9 (SEQ ID NO: 133) demostró tener una tolerancia vegetativa, y

000205

ninguno de los acontecimientos ensayados fue reproductivamente tolerante. Todos los acontecimientos que comprendían EXP–Zm.UbqM1:1:7 (SEQ ID NO: 141) demostraron tener una tolerancia vegetativa, pero la evaluación de la tolerancia reproductiva está todavía en curso de realización.

Ejemplo 15: Análisis de la expresión mediante diferentes secuencias de empalme de intrón de extremo 3′/empalme de exón.

Unas células de protoplasto de hojas de maíz y trigo fueron transformadas con constructos para la expresión en plantas que comprendían secuencias de EXP que impulsan la expresión de GUS que comprende el mismo promotor y líder pero que tienen diferentes nucleótidos de extremo 3′ después de la secuencia de empalme empalme intrón/exón, 5′–AG–3′ para ver si la expresión es afectada por el pequeño cambio en la secuencia. También se comparó la expresión con la de los dos plásmidos de control constitutivos.

Se construyen constructos para la expresión en plantas que comprendían un casete de expresión de GUS. Los vectores resultantes comprenden el promotor de ubiquitina *Coix lacryma–jobi*n, P–CI.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 80) operablemente ligado 5′ a la secuencia líder, L–CI.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 81), operablemente ligado 5′ a un elemento intrón mostrado en la siguiente Tabla 50, cada uno de los cuales comprende diferentes nucleótidos en el mismo extremo 3′ justo antes del empalme de la secuencia 5′–AG–3′ de empalme intrón/exón, operablemente ligado 5′ a una secuencia de codificación de GUS que está operablemente ligado 5′ a T–AGRtu.nos–1:1:13 (SEQ ID NO: 127) 3′ UTR. En la siguiente Tabla 50 se muestran los constructos para la expresión en plantas y la correspondiente secuencia de extremo 3′.

Tabla 50. Constructos para la expresión en plantas, los intrones y la secuencia de extremo en 3′ después de la secuencia 5′–AG–3′ de empalme de empalme intrón/exón.

000207

Constructo plásmido	Secuencia en EXP	SEQ ID NO:	Variante de Intrón	Nucleótidos de extremo 3' inmediatamente consecutivos al sitio de empalme AG
pMON140889	EXP–CI.Ubq1:1:10	98	I–CI.Ubq1–1:1:6 (SEQ ID NO: 94)	GTC
pMON146795	EXP–CI.Ubq1:1:18	99	I–CI.Ubq1–1:1:7 (SEQ ID NO: 92)	GTG
pMON146796	EXP–CI.Ubq1:1:19	100	I–CI.Ubq1–1:1:8 (SEQ ID NO: 101)	GCG
pMON146797	EXP–CI.Ubq1:1:20	102	I–CI.Ubq1–1:1:9 (SEQ ID NO: 103)	GAC
pMON146798	EXP–CI.Ubq1:1:21	104	I–CI.Ubq1–1:1:10 (SEQ ID NO: 105)	ACC
pMON146799	EXP–CI.Ubq1:1:22	106	I–CI.Ubq1–1:1:11 (SEQ ID NO: 107)	GGG
pMON14680	EXP–CI.Ubq1:1:23	108	I–CI.Ubq1–	GGT

000208

0			1:1:12 (SEQ ID NO: 109)	
pMON146801	EXP–Cl.Ubq1:1:24	110	I–Cl.Ubq1–1:1:13 (SEQ ID NO: 111)	CGT
pMON146802	EXP–Cl.Ubq1:1:25	112	I–Cl.Ubq1–1:1:14 (SEQ ID NO: 113)	TGT
pMON25455	EXP–Os.Act1:1:9	179		Constitutive Control
pMON65328	EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	163		Control constitutivo

Unos protoplastos de maíz y trigo fueron transformados como descrito anteriormente y sometidos a ensayo para establecer la expresión de GUS y de luciferasa. La siguiente Tabla 51 muestra los valores promedios de GUS y RLuc para la expresión del protoplasto tanto de maíz como de trigo.

000209

Tabla 51. Valores promedios de GUS y de RLuc para células de protoplasto de maíz y trigo.

		Maíz			Trigo		
Secuencia en EXP	Nucleótidos de extremo 3' inmediatamente después del sitio AG 3´	GUS promedio	RLuc promedio	GUS/ RLuc	GUS promedio	RLuc promedio	GUS/ RLuc
EXP–Cl.Ubq1:1:10	GTC	140343.0	93870.75	1.50	40906.25	17381.75	2.35
EXP–Cl.Ubq1:1:18	GTG	143106.25	60565.25	2.36	56709.00	17898.75	3.17
EXP–Cl.Ubq1:1:19	GCG	136326.83	88589.75	1.54	43211.00	17352.50	2.49
EXP–Cl.Ubq1:1:20	GAC	138110.83	104751.42	1.32	31711.50	17953.75	1.77
EXP–Cl.Ubq1:1:21	ACC	137906.75	72519.50	1.90	54164.17	17772.83	3.05
EXP–Cl.Ubq1:1:22	GGG	137306.83	92643.42	1.48	55198.25	14476.75	3.81
EXP–	GGT	144085.	64351.	2.24	43008.	13911.	3.09

000210

Cl.Ubq1:1:23		50	25		83	50	
EXP–Cl.Ubq1:1:24	CGT	142061.50	65884.00	2.16	51210.50	15041.00	3.40
EXP–Cl.Ubq1:1:25	TGT	140353.00	61249.50	2.29	49577.75	15348.25	3.23
EXP–Os.Act1:1:9	Control Constitutivo	37665.25	65835.50	0.57	10830.25	17716.50	0.61
EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	Control Constitutivo	49833.75	41268.75	1.21	15598.83	14877.50	1.05

Los valores de GUS/RLuc para cada secuencia de EXP de ubiquitina de *Coix lacryma–jobi* de la Tabla 46 precedente fueron utilizados para normalizar la expresión con respecto a los dos controles constitutivos EXP–Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163), y se los presenta en la siguiente Tabla 52.

Tabla 52. Valores de expresión normalizados de las secuencias de EXP de ubiquitina de *Coix lacryma-jobi* con respecto a EXP-Os.Act1:1:9 (SEQ ID NO: 179) y con respecto a EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 163).

		Maíz		Trigo	
Secuencia en EXP	Nucleótidos de extremo 3' inmediatamente después del sitio AG 3´	GUS/RLuc Normalizado con respecto a EXP-Os.Act1:1:9	GUS/RLuc Normalizado con respecto a EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	GUS/Rluc normalizado con respecto a EXP-Os.Act1:1:9	GUS/Rluc normalizado con respecto a EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1
EXP-Cl.Ubq1:1:10	GTC	2.61	1.24	3.85	2.24
EXP-Cl.Ubq1:1:18	GTG	4.13	1.96	5.18	3.02
EXP-Cl.Ubq1:1:19	GCG	2.69	1.27	4.07	2.38
EXP-Cl.Ubq1:1:20	GAC	2.30	1.09	2.89	1.68
EXP-Cl.Ubq1:1:21	ACC	3.32	1.57	4.99	2.91
EXP-	GGG	2.59	1.23	6.24	3.64

		Maíz		Trigo	
Secuencia en EXP	Nucleótidos de extremo 3' inmediatamente después del sitio AG 3´	GUS/RLuc Normalizado con respecto a EXP–Os.Act1:1:9	GUS/RLuc Normalizado con respecto a EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	GUS/Rluc normalizado con respecto a EXP–Os.Act1:1:9	GUS/Rluc normalizado con respecto a EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1
Cl.Ubq1:1:22					
EXP–Cl.Ubq1:1:23	GGT	3.91	1.85	5.06	2.95
EXP–Cl.Ubq1:1:24	CGT	3.77	1.79	5.57	3.25
EXP–Cl.Ubq1:1:25	TGT	4.01	1.90	5.28	3.08
EXP–Os.Act1:1:9	Control Constitutivo	1.00	0.47	1.00	0.58
EXP–CaMV.35S–enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1	Control Constitutivo	2.11	1.00	1.72	1.00

Como se muestra en la Tabla 52 precedente, cada una de las secuencias de EXP de ubiquitina de *Coix lacryma–jobi* proveyó una expresión que era mayor que la del control constitutivo tanto en el maíz como en el trigo. La expresión en los protoplastos de maíz fue relativamente similar para todas las secuencias de ubiquitina de *Coix*. La expresión en el trigo era un poco más variable. El uso de diferentes nucleótidos de extremo en 3´ después de la secuencia de empalme de intrón/exón, 5´–AG–3´ no pareció afectar drásticamente la expresión GUS con la excepción de GUS impulsado por EXP–CI.Ubq1:1:20 (SEQ ID NO: 102). EXP–CI.Ubq1:1:20 comprende las secuencias de nucleótidos de extremo 3´, 5´–GAC–3´ después de la secuencia de empalme de intrón/exón, 5´–AG–3´ e hizo que la expresión decayese ligeramente con respecto a las otras secuencias de EXP de ubiquitina de *Coix*. La evaluación del ARN de mensajero empalmado resultante mostró que aproximadamente 10% del mARN que se expresó mediante EXP–CI.Ubq1:1:20 (SEQ ID NO: 102) para impulsar la expresión de GUS estaba inadecuadamente empalmado. El mARN resultante de la expresión de GUS mediante las otras secuencias de EXP de ubiquitina de *Coix* pareció procesarse correctamente. Este experimento provee la evidencia que cualquiera de los nucleótidos de extremo 3' para cualquier de las variantes de intrón presentadas en la Tabla 2 del Ejemplo 1 con la excepción de la secuencia de extremo 3' 5´–GAC–3´ que se encuentra asociado solamente con el elemento intrón, I–CI.Ubq1–1:1:9 (SEQ ID NO: 103) sería adecuado para su uso en casetes de expresión de transgén sin una pérdida significativa de actividad y procesamiento.

Ejemplo 16: Reforzadores derivados de los elementos reguladores.

Se derivan reforzadores a partir de los elementos promotor provistos en la presente, tales como aquellos presentados como las SEQ ID NOS: 2, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 23, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 46, 50, 56, 60, 64, 66, 70, 74, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 91, 96 y 135. El elemento reforzador puede estar comprendido por uno o más elementos reguladores cis que, cuando están operablemente ligados en 5′ o 3′ a un elemento promotor, u operablemente ligados 5′ o 3′ a elementos reforzadores adicionales que están operablemente ligados a un promotor, pueden reforzar o modular la expresión de un transgén, o proveer la expresión de un transgén en un tipo específico de células o de órgano de planta o en un instante de tiempo particular en el ritmo de desarrollo o circadiano. Los reforzadores se preparan removiendo la caja TATA o elementos funcionalmente similares y cualesquiera secuencias situadas corriente abajo con respecto a los promotores que permitan que la transcripción se inicie a partir de los promotores provistos en la presente como arriba descrito, inclusive a partir de fragmentos de los mismos, en los que la caja TATA o elementos funcionalmente similares y secuencias situadas corriente abajo son removidos. El elemento reforzador, E–Cl.Ubq1–1:1:1 (SEQ ID NO: 89) que se deriva a partir del elemento promotor, se provee en la presente a efectos de demostrar los reforzadores derivados a partir de un elemento promotor.

Los elementos reforzadores pueden ser derivados a partir de los elementos promotores provistos en la presente y ser clonados mediante métodos conocidos en la especialidad para ser operablemente ligados en 5′ o 3′ a un elemento promotor, o para ser operablemente ligados en 5′ o 3′ a

elementos reforzadores adicionales que están operablemente ligados a un promotor. Como alternativa, los elementos reforzadores se clonan mediante métodos conocidos en la especialidad, de manera de ser operablemente ligados a una o más copias del elemento reforzador que están operablemente ligadas en 5′ o 3′ a un elemento promotor, u operablemente ligadas en 5′ o 3′ a elementos reforzadores adicionales que están operablemente ligados a un promotor. Los elementos reforzadores también pueden ser clonados para ser operablemente ligados en 5′ o 3′ a un elemento promotor derivado del organismo de un género diferente, o para ser operablemente ligados en 5′ o 3′ a elementos reforzadores adicionales derivados de organismos de otros géneros o de un organismo del mismo género que están operablemente ligados a un promotor derivado del organismo del mismo género o de un género diferente, siendo el resultado un elemento regulador quimérico. Se construye un vector de transformación de planta para la expresión de GUS mediante métodos conocidos en ,la especialidad similares a los constructos descritos en los ejemplos precedentes en los que los vectores resultantes para la expresión en plantas contienen una región de bordee a la derecha tomada de *A. tumefaciens*, un primer casete de transgén para ensayar el elemento regulador o elemento quimérico que comprende un elemento regulador o regulador quimérico, operablemente ligado a un intrón derivado de la proteína de termochoque HSP70 de *Z. mays* (I–Zm.DnaK–1:1:1 SEQ ID NO: 144) o cualquiera de los intrones presentados en la presente o cualquier otro intrón, operablemente ligado a una secuencia de codificación para ß–glucuronidasa (GUS) que sea posee un intrón procesable (GUS–2, SEQ ID NO: 160) sea un no intrón (GUS–1, SEQ ID NO: 159), operablemente ligado a la nopalina

sintasa 3´ UTR de *A. tumefaciens* (T–AGRtu.nos–1:1:13, SEQ ID NO: 161) o al 3´ UTR del gen de proteína de transferencia de lípidos del arroz (T–Os.LTP–1:1:1, SEQ ID NO: 175); y segundo casete de selección de transgenes utilizado para la selección de células de plantas transformadas que confiere una resistencia contra el herbicida glifosato (impulsada por el promotor Actina 1 del arroz), o como alternativa, contra el antibiótico kanamicina (impulsada por el promotor Actina 1 del arroz) y una región de borde a la izquierda tomada de *A. tumefaciens*. Se utilizan los plásmidos resultantes para transformar plantas de maíz o plantas de otros géneros mediante los métodos descritos anteriormente o mediante otros métodos mediados por *Agrobacterium* o de bombardeo de partículas, conocidos en la especialidad. Como alternativa, se transforman elementos derivados del maíz o plantas de otros géneros mediante métodos conocidos en la especialidad, para llevar a cabo ensayos transitorios.

La expresión de GUS impulsada por el elemento regulador que comprende uno o más reforzadores se evalúa en ensayos estables o transitorios con plantas para determinar los efectos del elemento reforzador sobre la expresión de un transgén. Las modificaciones en uno o más elementos reforzadores o la duplicación de uno o más elementos reforzadores se llevan a cabo en base a una experimentación empírica y en base a la regulación resultante de la expresión del gen que se observa mediante cada composición del elemento regulador. La alteración de las posiciones relativas de uno o más reforzadores en el elemento regulador o quimérico regulador puede afectar la actividad transcripcional o el carácter específico del elemento regulador o quimérico regulador, y se determina empíricamente a efectos de identificar los

mejores reforzadores en el perfil deseado para la expresión del transgén dentro de la planta de maíz o de una planta de otro género.

Ejemplo 17: Análisis del refuerzo por intrón de la actividad de GUS mediante protoplastos derivados de plantas.

Se selecciona un intrón en base a experimentación y comparación con un control vector de expresión sin intrón a efectos de seleccionar empíricamente un intrón y configuración dentro del ordenamiento del elemento T–ADN del vector para la expresión óptima de un transgén. Por ejemplo, en la expresión de un gen de resistencia a un herbicida, tal como el CP4 que confiere una tolerancia al glifosato, es deseable tener una expresión del transgén dentro de los tejidos reproductivos así como también en los tejidos vegetativos, para impedir la pérdida de rendimiento cuando se aplique el herbicida. En este caso se seleccionaría un intrón en base a su capacidad, cuando está operablemente ligado a un promotor constitutivo, de reforzar la expresión del transgén que confiere la resistencia al herbicida, particularmente dentro de las células y tejidos reproductivas de la planta transgénica con lo que a la planta transgénica se le proveería una tolerancia, tanto vegetativa como reproductiva, cuando se la rocía con el herbicida. En la mayoría de los genes de ubiquitina, el 5′ UTR comprende un líder, que tiene una secuencia de intrón incluida en él. Por lo tanto, se ensayaron los elementos de expresión para tales genes mediante la totalidad del 5′ UTR que comprendía el promotor, líder, e intrón. Para lograr diferentes perfiles de expresión o para modular el nivel de la expresión del transgén, es posible remover el intrón de un elemento de expresión de este tipo, o sustituirlo con un intrón heterólogo.

Se identifican los intrones presentados en la presente como SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 182 mediante contigs de ADN genómico en comparación con clústeres de rótulos de secuencia expresados o en base a contigs de cADN para identificar secuencias de exones e intrones dentro del ADN genómico. Además, también se utilizan secuencias 5´ UTR o líder para definir el empalme intrón/exón empalme de uno o más intrones bajo condiciones cuando la secuencias del gen codifica un secuencia líder que es interrumpida por uno o más intrones. Se clonan los intrones mediante métodos conocidos en la especialidad en un vector de transformación de plantas a ser operablemente ligado en 3´ en un elemento regulador transcripcional y fragmento de líder y para ser operablemente ligado en 5´ a sea un segundo fragmento de lidero sea a secuencias de codificación, por ejemplo como se ilustra en los dos casetes de transgén presentados en la Figura 1.

Por lo tanto, por ejemplo, un primer casete de transgén posible (Configuración de casete de transgén 1 en la Figura 8) comprende un promotor o elemento promotor quimérico [A], operablemente ligado en 5´ a un elemento líder [B], operablemente ligado en 5´ a un elemento intrón de ensayo [C], operablemente ligado a una región de codificación [D], que está operablemente ligado a un elemento 3´ UTR [E]. Como alternativa, un segundo casete de expresión de transgén posible (Configuración de casete de transgén 2 en la Figura 8) está comprendido por un elemento promotor o promotor quimérico [F], operablemente ligado en 5´ a un primer elemento líder o a un fragmento del primer elemento líder [G], operablemente ligado en 5´ a un elemento intrón de

ensayo [H], operablemente ligado en 5´ a un segundo elemento líder o a un segundo fragmento del primer líder [I], operablemente ligado a una región de codificación [J], que está operablemente ligada a un elemento 3´ UTR [K]. Además, un tercer casete de transgén posible (Configuración de casete de transgén 3 en la Figura 8) está comprendido por un promotor o elemento promotor quimérico [L], operablemente en ligado 5´ a un elemento líder [M], operablemente ligado en 5´ a un primer fragmento del elemento de la secuencia de codificación [N], operablemente ligado en 5´ a un elemento intrón [O], operablemente ligado en 5´ a un segundo fragmento del elemento de secuencia de codificación [P], que está operablemente ligado a un elemento 3´ UTR [Q]. La Configuración de casete de transgén 3 está diseñada para permitir el splicing del intrón de una manera de producir un marco de lectura abierto completo sin un corrimiento de marco entre los fragmentos primero y segundo de la secuencia de codificación.

Los seis primeros nucleótidos en el extremo 5' y los 6 últimos nucleótidos en el extremo 3´ de los intrones presentados como SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 182 representan nucleótidos antes y después del empalme de intrón/exón empalme, respectivamente. Estas breves secuencias de 6 nucleótidos, por ejemplo, pueden ser modificadas por el hecho de tener una secuencia adicional adjunta (*es decir* nativa o artificial) para facilitar la clonación del intrón en un vector de transformación de planta, siempre y cuando los nucleótidos primero y segundo desde el extremo 5´ (GT) y el nucleótido cuarto y quinto desde el extremo 3´ (AG) de las SEQ ID NOS: 4, 7,

21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 182 queden preservados, con lo que se preserva el empalme intrón/exón empalme del intrón. Como se expuso en lo que precede, puede ser preferible evitar mediante la secuencia de nucleótido AT o del nucleótido A justo antes del extremo 5' del sitio de empalme (GT) y el nucleótido G o la secuencia de nucleótidos TG, respectivamente justo después del extremo 3' del sitio de empalme (AG), eliminar la posibilidad de que se formen codones de partida no deseados durante el procesamiento del ARN mensajero en el transcripto final. Por lo tanto, es posible modificar la secuencia alrededor de los sitios de empalme de empalme de los extremos 5´ o 3´.

Se someten los intrones a un ensayo para establecer un efecto de refuerzo por medio de la capacidad de reforzar la expresión en un ensayo transitorio o estable sobre plantas. Para un ensayo transitorio del refuerzo del intrón, se construye un vector de planta base mediante métodos conocidos en la especialidad. Se clona el intrón en un vector de planta de base que comprende un casete de expresión que comprende un promotor constitutivo tal como el promotor virus mosaico de coliflor, P–CaMV.35S–enh–1:1:9 (SEQ ID NO: 176), operablemente ligado en 5´ a un elemento líder, L–CaMV.35S–1:1:15 (SEQ ID NO: 177), operablemente ligado en 5´ a un elemento intrón de ensayo (por ejemplo, uno de las siguientes SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 182), operablemente ligado a una secuencia de codificación para ß–glucuronidasa (GUS) que posee un intrón procesable (GUS–2, SEQ ID NO:

160) o un no intrón (GUS–1, SEQ ID NO: 159), operablemente ligado a la nopalina sintasa 3´´UTR tomado de *A. tumefaciens* (T–AGRtu.nos–1:1:13, SEQ ID NO: 161). Unas células de protoplasto derivadas de maíz o tejido de plantas de otros géneros son transformados con el vector de planta de base y con vectores de control luciferasa como descrito anteriormente en el Ejemplo 2 anterior y ensayadas para determinar su actividad. Para comparar la capacidad relativa del intrón para reforzar la expresión, se expresan los valores de GUS en forma de una relación entre la actividad del GUS y la actividad de la luciferasa, y se compara con aquellos niveles impartidos por un constructo que comprende el promotor constitutivo operablemente ligado a un intrón estándar conocido tal como el intrón derivado a partir de la proteína de termochoque HSP70 de *Zea mays*, I–Zm.DnaK–1:1:1 (SEQ ID NO: 178) así como un constructo que comprende el promotor constitutivo pero sin un intrón operablemente ligado al promotor.

Para el ensayo estable en plantas de los intrones presentados como SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 182, se construye un vector de transformación de expresión de GUS de manera similar a los constructos descritos en los ejemplos anteriores en los que los vectores resultantes para la expresión en plantas contienen una región de borde a la derecha de *A. tumefaciens,* un primer casete de transgén para ensayar el intrón que comprende un promotor constitutivo tal como el promotor del virus mosaico de coliflor P–CaMV.35S–enh–1:1:9 (SEQ ID NO: 176), operablemente ligado en 5´ a un elemento líder, L–CaMV.35S–1:1:15 (SEQ ID NO: 177), operablemente

ligado en 5′ a un elemento intrón de ensayo provisto en la presente, operablemente ligado a una secuencia de codificación para ß–glucuronidasa (GUS) que posea un intrón procesable (GUS–2, SEQ ID NO: 160) o ningún intrón (GUS–1, SEQ ID NO: 158), operablemente ligado a la nopalina sintasa 3′ UTR de *A. tumefaciens* (T–AGRtu.nos–1:1:13, SEQ ID NO: 161); un segundo casete de selección de transgén utilizado para la selección de células de plantas transformadas que confiere una resistencia al glifosato (impulsado por el promotor actina del arroz), o como alternativa, contra el antibiótico kanamicina (impulsado por el promotor actina 1 del arroz), y una región de borde a la izquierda de *A. tumefaciens*. Se utilizan los plásmidos resultante para transformar plantas de maíz o plantas de otros géneros mediante los métodos descritos anteriormente o mediante métodos mediados por *Agrobacterium* conocidos en la especialidad. Se seleccionan transformantes de copia individual o con una baja cantidad de copias para su comparación con plantas transformadas en copia simple en una cantidad baja de copias, transformadas con un vector de transformación de plantas idéntico al vector de ensayo pero sin el intrón de ensayo para determinar si el intrón de ensayo provee un efecto mediado por intrón.

Cualquiera de los intrones presentados como SEQ ID NOS: 4, 7, 21, 24, 36, 44, 48, 52, 54, 58, 62, 68, 72, 82, 92, 94, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 118, 120, 122, 127, 129, 131, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158 y 182 puede ser modificado de diversas maneras, tal como mediante la supresión de fragmentos dentro de la secuencia de intrón, que puede reducir la expresión o duplicación de fragmentos con el intrón que pueda reforzar la expresión. Además, las secuencias dentro del intrón que puedan afectar el

carácter específico de la expresión con respecto a tipos de células o tejidos en particular, pueden ser duplicadas o alteradas o suprimidas de manera de afectar la expresión del transgén. Además, los intrones provistos en la presente pueden ser modificados a efectos de remover cualesquiera codones de partida potenciales (ATG), que pueden hacer que transcriptos no intencionales sean expresados a partir de intrones incorrectamente empalmadoa en forma de proteínas diferente, más largas o truncadas, Una vez que el intrón haya sido ensayado empíricamente, o ha sido alterado en base a experimentación, se utiliza el intrón para reforzar la expresión de un transgén en plantas establemente transformadas que pueden ser de cualquier género de planta monocotiledónea o dicotiledónea, siempre y cuando el intrón provea un refuerzo del transgén. También es posible utilizar el intrón para reforzar la expresión en otros organismos, tales como en células de algas, hongos o de animales, siempre y cuando el intrón provea un refuerzo o atenuación o carácter especifico de la expresión del transgén al que está operablemente ligado.

Habiendo ilustrado y descrito los principios de la presente invención, debería ser evidente para las personas con pericia en la especialidad que es posible modificar la invención en cuanto a disposiciones y detalles, sin apartarse de dichos principios. Mediante la presente todas las publicaciones y documentos patente mencionados en la presente se incorporan en la presente en la misma amplitud en que se indica que cada publicación o solicitud de patente, individuales, se incorpora en la presente, de manera especifica e individual, a título de referencia.

REIVINDICACIONES DIVISIONAL

EXPEDIENTE No. 13 250534

GRUPO INVENTIVO 6

1. Una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en:

a) una secuencia con 85 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs: 79, 80, 99 y 100;

b) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NOs: 79, 80, 99 y 100; y

c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOs: 79, 80, 99 y 100;

en donde dicha secuencia está ligada operativamente con una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga.

2. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha secuencia tiene 90 por ciento de identidad de secuencia con la secuencia de ADN de cualquiera de SEQ ID NOs: 79, 80, 99 y 100.

3. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha secuencia tiene 95 por ciento de identidad de secuencia con la secuencia de ADN de cualquiera de SEQ ID NOs: 79, 80, 99 y 100.

4. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la molécula de polinucleótido transcribible heteróloga comprende un gen de interés agronómico.

5. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el gen de interés agronómico codifica una proteína de resistencia a herbicidas.

6. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el gen de interés agronómico codifica una proteína pesticida.

7. Una célula de planta transgénica que comprende una molécula de ADN heteróloga que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

a) una secuencia con 85 por ciento de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs: 79, 80, 99 y 100;

b) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NOs: 79, 80, 99 y 100; y

c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOs: 79, 80, 99 y 100;

en donde dicha secuencia está ligada operativamente con una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga.

8. La célula de planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha célula de planta transgénica es una célula de planta monocotiledónea.

9. La célula de planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha célula de planta transgénica es una célula de planta dicotiledónea.

10. Un producto de consumo que comprende la molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1.

11. El producto de consumo de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el producto de consumo es concentrado de proteína, aislado de proteína, grano, almidón, semillas, comida, harina, biomasa o aceite de semillas.

000226

RESUMEN

La presente invención proporciona nuevas moléculas de ADN y constructos, que incluyen sus secuencias de nucleótidos, de utilidad para modular la expresión génica en plantas y células de plantas. La invención también proporciona plantas transgénicas, células de plantas, partes de plantas, semillas y productos de consumo que comprenden las moléculas de ADN operativamente ligadas a polinucleótidos transcribibles heterólogos, junto con métodos para su uso.

```
P-ANDge.Ubq1-1:1:9      ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     AGCAGACTCGCATTATCGATGGAGGGGTGGGTTTAGAACCCTGAAAACTGGTACTGTTTC
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ----------------------------------------------------------

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     GAACTGAAAAACACTGTAGCACTTTTCGTTTGTTTGTGGTAAATATTATCTTACTATGGT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ----------------------------------------------------------

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     CTAACTAGGCTCAAAAGAATCGTCTCGCAATGTACATCTAAATTATGCAATTAGTTATTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ----------------------------------------------------------

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TGTTTACCTGCATTTCATACTCCGAGCATGCGTCTTTTGGTACATTTAATGCTTCGATGT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ----------------------------------------------------------

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     GATGGGAATTTTAAAAATTTTGGAGAAAAGTTGGTTTCTAAACACCCCCGAGGACGAAAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ----------------------------------------------------------

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TCGATTCGGTCTTTCACGCGGATGCAGCAACTGCAGTGCGCAGGATACCATCTTAGCCGT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ----------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ----------------------------------------------------------
```

FIG. 1a

```
P-ANDge.Ubq1-1:1:9      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TGCGTCGAAGTTCGCTTTGCTAACGTTTTGAGAAAATTAAACCAGCTTTGACCAACGTGA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ------------------------------------------------------------

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     GACGAGCGCCTTACGTGGCAGTGTAATGGAACCGGGCACGGCAAGTTTGACGCTGTAGTG
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ------------------------------------------------------------

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      ---------CTCGTTACGTTTGGCACAACTTAGTTGAATCCGGCTTCCGGCAAACTATAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TTAGCCGGTCTCGTTACGTTTGGCACAACTTAGTTGAATCCGGCTTCCGGCAAACTATAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ------------------------------------------------------------

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      GGCAAGTTAGACCCAAGTGTGAGCCGGCCACCGCAAGTTATTGGGACATTATACGTAGGA
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     GGCAAGTTAGACCCAAGTGTGAGCCGGCCACCGCAAGTTATTGGGACATTATACGTAGGA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ------------------------------------------------------------

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      AGCAAGTGTATAATAAGAATATGAGATAATGTAAGCAGCTATATGAATCATCACGTCATA
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     AGCAAGTGTATAATAAGAATATGAGATAATGTAAGCAGCTATATGAATCATCACGTCATA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ------------------------------------------------------------

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      TTTATGTTAAGATGAAGAGGATAGAATAAACGGTATGTAAATTTATAGCGAGTGATAGAC
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TTTATGTTAAGATGAAGAGGATAGAATAAACGGTATGTAAATTTATAGCGAGTGATAGAC
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ------------------------------------------------------------
```

FIG. 1b

```
P-ANDge.Ubq1-1:1:9      GGGCACAAGGCCTCCTAGCTATTTCCATAAATCGGATTTTGTAAGAACAAAAAAGAGGAC
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     GGGCACAAGGCCTCCTAGCTATTTCCATAAATCGGATTTTGTAAGAACAAAAAAGAGGAC
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ------------------------------------------------------------

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      TTATTATAAGAGAATGTGGTAAGTAAGTATACTCTCTCCGTTTCAAATTATAAGTTGTTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TTATTATAAGAGAATGTGGTAAGTAAGTATACTCTCTCCGTTTCAAATTATAAGTTGTTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ------------------------------------------------------------

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      TGATTTTTTTGGTACATCTATTTTACTATGCATTAGATATAATAATGTGTCTAGATACAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TGATTTTTTTGGTACATCTATTTTACTATGCATTAGATATAATAATGTGTCTAGATACAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ------------------------------------------------------------

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      AACAAAATGGATGAATCAAAAAAGTCAAAGTGATTTACAATTTGGAACGGAGAGAGTAAG
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     AACAAAATGGATGAATCAAAAAAGTCAAAGTGATTTACAATTTGGAACGGAGAGAGTAAG
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ------------------------------------------------------------G

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      TTCAAGCCGTCAAGGCACTTCTATGCAACCACAGTCAACTTGAATGCCGCTTGAGTGCCT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TTCAAGCCGTCAAGGCACTTCTATGCAACCACAGTCAACTTGAATGCCGCTTGAGTGCCT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     TTCAAGCCGTCAAGGCACTTCTATGCAACCACAGTCAACTTGAATGCCGCTTGAGTGCCT

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      TCTCAAGTTTTTTTTTCTTGCAAAAATCATTTCTTTTTTTTTAAAAAAAGTATAATTTGGA
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TCTCAAGTTTTTTTTTCTTGCAAAAATCATTTCTTTTTTTTTAAAAAAAGTATAATTTGGA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     TCTCAAGTTTTTTTTTCTTGCAAAAATCATTTCTTTTTTTTTAAAAAAAGTATAATTTGGA
```

FIG. 1c

```
P-ANDge.Ubq1-1:1:9      TCGTGCAAATTTCTCTCTAGGTGTGTGTGTGACTGTGTGAGTAACAATTTCTCTAGTTGT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TCGTGCAAATTTCTCTCTAGGTGTGTGTGTGACTGTGTGAGTAACAATTTCTCTAGTTGT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ----------------------------------------------------TCTAGTTGT
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     TCGTGCAAATTTCTCTCTAGGTGTGTGTGTGACTGTGTGAGTAACAATTTCTCTAGTTGT

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      GCGCGACTGCTGCTTACTTTGGAGATTACAATATCTTTCTAAAATGCTTCGATTACTTAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     GCGCGACTGCTGCTTACTTTGGAGATTACAATATCTTTCTAAAATGCTTCGATTACTTAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     GCGCGACTGCTGCTTACTTTGGAGATTACAATATCTTTCTAAAATGCTTCGATTACTTAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     GCGCGACTGCTGCTTACTTTGGAGATTACAATATCTTTCTAAAATGCTTCGATTACTTAT

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      TTATAAACCGTCTCTAAGGCCAATTGCTCAAGATTCATTCAACAATTGAAACGTCTCACA
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TTATAAACCGTCTCTAAGGCCAATTGCTCAAGATTCATTCAACAATTGAAACGTCTCACA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     TTATAAACCGTCTCTAAGGCCAATTGCTCAAGATTCATTCAACAATTGAAACGTCTCACA
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     TTATAAACCGTCTCTAAGGCCAATTGCTCAAGATTCATTCAACAATTGAAACGTCTCACA

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      TGATTAAATCATATAAAGTTTCTAAGTCTTGTTTGACAAGATTTTTTTAGATTTTCATCT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TGATTAAATCATATAAAGTTTCTAAGTCTTGTTTGACAAGATTTTTTTAGATTTTCATCT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     TGATTAAATCATATAAAGTTTCTAAGTCTTGTTTGACAAGATTTTTTTAGATTTTCATCT
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     TGATTAAATCATATAAAGTTTCTAAGTCTTGTTTGACAAGATTTTTTTAGATTTTCATCT

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      AAATTGGATGAAACTATCAAACACTAATTTTAAAAAATATAAGAGAAGCTCCGGAGATAA
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     AAATTGGATGAAACTATCAAACACTAATTTTAAAAAATATAAGAGAAGCTCCGGAGATAA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     AAATTGGATGAAACTATCAAACACTAATTTTAAAAAATATAAGAGAAGCTCCGGAGATAA
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     AAATTGGATGAAACTATCAAACACTAATTTTAAAAAATATAAGAGAAGCTCCGGAGATAA

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      AAGGTCGTCTATGTTATTATAAGAGTAAAGTCGTCTATTCTCTTCGTCCCAACATATATA
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     AAGGTCGTCTATGTTATTATAAGAGTAAAGTCGTCTATTCTCTTCGTCCCAACATATATA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     AAGGTCGTCTATGTTATTATAAGAGTAAAGTCGTCTATTCTCTTCGTCCCAACATATATA
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     AAGGTCGTCTATGTTATTATAAGAGTAAAGTCGTCTATTCTCTTCGTCCCAACATATATA
```

FIG. 1d

```
P-ANDge.Ubq1-1:1:9      ATTCTAAGCATGAATTGCTTTCTTTTTGGACAAAAGGAGCATGCCACAACACAAGAATGA
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ----------------------------------------------CACAAGAATGA
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     ATTCTAAGCATGAATTGCTTTCTTTTTGGACAAAAGGAGCATGCCACAACACAAGAATGA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ATTCTAAGCATGAATTGCTTTCTTTTTGGACAAAAGGAGCATGCCACAACACAAGAATGA
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ATTCTAAGCATGAATTGCTTTCTTTTTGGACAAAAGGAGCATGCCACAACACAAGAATGA

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      TGTCACCGTCATGCTTGGATCCTTTTATGGTAAAGCTTCACCTTCTATAATCTAACAATA
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      TGTCACCGTCATGCTTGGATCCTTTTATGGTAAAGCTTCACCTTCTATAATCTAACAATA
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TGTCACCGTCATGCTTGGATCCTTTTATGGTAAAGCTTCACCTTCTATAATCTAACAATA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     TGTCACCGTCATGCTTGGATCCTTTTATGGTAAAGCTTCACCTTCTATAATCTAACAATA
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     TGTCACCGTCATGCTTGGATCCTTTTATGGTAAAGCTTCACCTTCTATAATCTAACAATA

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      GAGAAATCAGGGAAAAATCATGTTTTGGTTGTTTTTATTTCTAACCTCCACAATAACTTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      GAGAAATCAGGGAAAAATCATGTTTTGGTTGTTTTTATTTCTAACCTCCACAATAACTTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     GAGAAATCAGGGAAAAATCATGTTTTGGTTGTTTTTATTTCTAACCTCCACAATAACTTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     GAGAAATCAGGGAAAAATCATGTTTTGGTTGTTTTTATTTCTAACCTCCACAATAACTTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     GAGAAATCAGGGAAAAATCATGTTTTGGTTGTTTTTATTTCTAACCTCCACAATAACTTT

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      GGTTTACCATTTTTTGTTTGATTTTAGTTTTAGAGAAGCGTTTATAACAGGACCTAAAAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      GGTTTACCATTTTTTGTTTGATTTTAGTTTTAGAGAAGCGTTTATAACAGGACCTAAAAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     GGTTTACCATTTTTTGTTTGATTTTAGTTTTAGAGAAGCGTTTATAACAGGACCTAAAAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     GGTTTACCATTTTTTGTTTGATTTTAGTTTTAGAGAAGCGTTTATAACAGGACCTAAAAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     GGTTTACCATTTTTTGTTTGATTTTAGTTTTAGAGAAGCGTTTATAACAGGACCTAAAAT

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      CTTTTTTCAGTACACAGTACAACGCAGACGCTCATACACGCACGCACACTCACCTCTATG
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      CTTTTTTCAGTACACAGTACAACGCAGACGCTCATACACGCACGCACACTCACCTCTATG
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     CTTTTTTCAGTACACAGTACAACGCAGACGCTCATACACGCACGCACACTCACCTCTATG
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     CTTTTTTCAGTACACAGTACAACGCAGACGCTCATACACGCACGCACACTCACCTCTATG
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     CTTTTTTCAGTACACAGTACAACGCAGACGCTCATACACGCACGCACACTCACCTCTATG

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      AACACACGTAAGAAAACCCTACACCTTGAGCACCTTCGAAGGACTGAGCCGGTAAATATA
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      AACACACGTAAGAAAACCCTACACCTTGAGCACCTTCGAAGGACTGAGCCGGTAAATATA
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     AACACACGTAAGAAAACCCTACACCTTGAGCACCTTCGAAGGACTGAGCCGGTAAATATA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     AACACACGTAAGAAAACCCTACACCTTGAGCACCTTCGAAGGACTGAGCCGGTAAATATA
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     AACACACGTAAGAAAACCCTACACCTTGAGCACCTTCGAAGGACTGAGCCGGTAAATATA
```

FIG. 1e

```
P-ANDge.Ubq1-1:1:9      GAGATTCTCGAAGTCACTATTAGCGCCTCGTTGTCAACGGGAATGTCGCTTACCACTTAA
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      GAGATTCTCGAAGTCACTATTAGCGCCTCGTTGTCAACGGGAATGTCGCTTACCACTTAA
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     GAGATTCTCGAAGTCACTATTAGCGCCTCGTTGTCAACGGGAATGTCGCTTACCACTTAA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     GAGATTCTCGAAGTCACTATTAGCGCCTCGTTGTCAACGGGAATGTCGCTTACCACTTAA
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ---------------------------------GTCAACGGGAATGTCGCTTACCACTTAA
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     GAGATTCTCGAAGTCACTATTAGCGCCTCGTTGTCAACGGGAATGTCGCTTACCACTTAA

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      AGCATAACGCCGAGAAATCCCGTAATAAATCCAGTAAAATACGAGCACCCGTGCCAAGTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      AGCATAACGCCGAGAAATCCCGTAATAAATCCAGTAAAATACGAGCACCCGTGCCAAGTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     AGCATAACGCCGAGAAATCCCGTAATAAATCCAGTAAAATACGAGCACCCGTGCCAAGTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     AGCATAACGCCGAGAAATCCCGTAATAAATCCAGTAAAATACGAGCACCCGTGCCAAGTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     AGCATAACGCCGAGAAATCCCGTAATAAATCCAGTAAAATACGAGCACCCGTGCCAAGTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     AGCATAACGCCGAGAAATCCCGTAATAAATCCAGTAAAATACGAGCACCCGTGCCAAGTT

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      GAATATTTGAACCCGAGTGGGTAGATTCCACCGCAAAGGACCTAACCAGATCATTTCGCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      GAATATTTGAACCCGAGTGGGTAGATTCCACCGCAAAGGACCTAACCAGATCATTTCGCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     GAATATTTGAACCCGAGTGGGTAGATTCCACCGCAAAGGACCTAACCAGATCATTTCGCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     GAATATTTGAACCCGAGTGGGTAGATTCCACCGCAAAGGACCTAACCAGATCATTTCGCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     GAATATTTGAACCCGAGTGGGTAGATTCCACCGCAAAGGACCTAACCAGATCATTTCGCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     GAATATTTGAACCCGAGTGGGTAGATTCCACCGCAAAGGACCTAACCAGATCATTTCGCA

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      AACAGGAACTAAAATCGGTAGAGAGCCCAGACAAAAGCCTTTCCTAAGAGCCACTCCAGT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      AACAGGAACTAAAATCGGTAGAGAGCCCAGACAAAAGCCTTTCCTAAGAGCCACTCCAGT
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     AACAGGAACTAAAATCGGTAGAGAGCCCAGACAAAAGCCTTTCCTAAGAGCCACTCCAGT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     AACAGGAACTAAAATCGGTAGAGAGCCCAGACAAAAGCCTTTCCTAAGAGCCACTCCAGT
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     AACAGGAACTAAAATCGGTAGAGAGCCCAGACAAAAGCCTTTCCTAAGAGCCACTCCAGT
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     AACAGGAACTAAAATCGGTAGAGAGCCCAGACAAAAGCCTTTCCTAAGAGCCACTCCAGT

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      GGAAGCCCCTACTTTAGGTATAAAATGCAATACTAGTGGGGCTCCTAAATAAACTTCTAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      GGAAGCCCCTACTTTAGGTATAAAATGCAATACTAGTGGGGCTCCTAAATAAACTTCTAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     GGAAGCCCCTACTTTAGGTATAAAATGCAATACTAGTGGGGCTCCTAAATAAACTTCTAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     GGAAGCCCCTACTTTAGGTATAAAATGCAATACTAGTGGGGCTCCTAAATAAACTTCTAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     GGAAGCCCCTACTTTAGGTATAAAATGCAATACTAGTGGGGCTCCTAAATAAACTTCTAT
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ------------------------------------------------------------
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     GGAAGCCCCTACTTTAGGTATAAAATGCAATACTAGTGGGGCTCCTAAATAAACTTCTAT

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      TTTTCATGGCCTTCTAAAATTCACTCCCAAACCCCTAGCTATAGAAGTCTCTTATCCATC
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      TTTTCATGGCCTTCTAAAATTCACTCCCAAACCCCTAGCTATAGAAGTCTCTTATCCATC
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TTTTCATGGCCTTCTAAAATTCACTCCCAAACCCCTAGCTATAGAAGTCTCTTATCCATC
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     TTTTCATGGCCTTCTAAAATTCACTCCCAAACCCCTAGCTATAGAAGTCTCTTATCCATC
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     TTTTCATGGCCTTCTAAAATTCACTCCCAAACCCCTAGCTATAGAAGTCTCTTATCCATC
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ----------------------CACTCCCAAACCCCTAGCTATAGAAGTCTCTTATCCATC
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     TTTTCATGGCCTTCTAAAATTCACTCCCAAACCCCTAGCTATAGAAGTCTCTTATCCATC
                                              ****************************************
```

FIG. 1f

```
P-ANDge.Ubq1-1:1:9      CTCTAAATAAAAATGGGAGTCTATTTTATTTCACCAGAGTTGATCGTAAATTTAGTCTCT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      CTCTAAATAAAAATGGGAGTCTATTTTATTTCACCAGAGTTGATCGTAAATTTAGTCTCT
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     CTCTAAATAAAAATGGGAGTCTATTTTATTTCACCAGAGTTGATCGTAAATTTAGTCTCT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     CTCTAAATAAAAATGGGAGTCTATTTTATTTCACCAGAGTTGATCGTAAATTTAGTCTCT
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     CTCTAAATAAAAATGGGAGTCTATTTTATTTCACCAGAGTTGATCGTAAATTTAGTCTCT
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     CTCTAAATAAAAATGGGAGTCTATTTTATTTCACCAGAGTTGATCGTAAATTTAGTCTCT
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     CTCTAAATAAAAATGGGAGTCTATTTTATTTCACCAGAGTTGATCGTAAATTTAGTCTCT
                        ************************************************************

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      CAAATTTTATAAGTTGAGGGTAGAGGATGACTGGAGTTGCTCTAAACGGACCTATCTTCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      CAAATTTTATAAGTTGAGGGTAGAGGATGACTGGAGTTGCTCTAAACGGACCTATCTTCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     CAAATTTTATAAGTTGAGGGTAGAGGATGACTGGAGTTGCTCTAAACGGACCTATCTTCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     CAAATTTTATAAGTTGAGGGTAGAGGATGACTGGAGTTGCTCTAAACGGACCTATCTTCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     CAAATTTTATAAGTTGAGGGTAGAGGATGACTGGAGTTGCTCTAAACGGACCTATCTTCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     CAAATTTTATAAGTTGAGGGTAGAGGATGACTGGAGTTGCTCTAAACGGACCTATCTTCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     CAAATTTTATAAGTTGAGGGTAGAGGATGACTGGAGTTGCTCTAAACGGACCTATCTTCA
                        ************************************************************

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      AGTGACCTCAGTGAGCCCGTTTAACGGCGTCGACAAGTTTAATCTAACGGACACCAACCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      AGTGACCTCAGTGAGCCCGTTTAACGGCGTCGACAAGTTTAATCTAACGGACACCAACCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     AGTGACCTCAGTGAGCCCGTTTAACGGCGTCGACAAGTTTAATCTAACGGACACCAACCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     AGTGACCTCAGTGAGCCCGTTTAACGGCGTCGACAAGTTTAATCTAACGGACACCAACCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     AGTGACCTCAGTGAGCCCGTTTAACGGCGTCGACAAGTTTAATCTAACGGACACCAACCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     AGTGACCTCAGTGAGCCCGTTTAACGGCGTCGACAAGTTTAATCTAACGGACACCAACCA
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     AGTGACCTCAGTGAGCCCGTTTAACGGCGTCGACAAGTTTAATCTAACGGACACCAACCA
                        ************************************************************

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      GAGAAGAGAACCACCGCCAGCGCCGAGCCAAGCGACGTTGACATCTTGGCGCGGCACGGC
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      GAGAAGAGAACCACCGCCAGCGCCGAGCCAAGCGACGTTGACATCTTGGCGCGGCACGGC
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     GAGAAGAGAACCACCGCCAGCGCCGAGCCAAGCGACGTTGACATCTTGGCGCGGCACGGC
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     GAGAAGAGAACCACCGCCAGCGCCGAGCCAAGCGACGTTGACATCTTGGCGCGGCACGGC
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     GAGAAGAGAACCACCGCCAGCGCCGAGCCAAGCGACGTTGACATCTTGGCGCGGCACGGC
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     GAGAAGAGAACCACCGCCAGCGCCGAGCCAAGCGACGTTGACATCTTGGCGCGGCACGGC
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     GAGAAGAGAACCACCGCCAGCGCCGAGCCAAGCGACGTTGACATCTTGGCGCGGCACGGC
                        ************************************************************

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      ATCTCCCTGGCGTCTGGCCCCCTCTCGAGACTTCCGCTCCACCTCCCACCGGTGGCGGTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      ATCTCCCTGGCGTCTGGCCCCCTCTCGAGACTTCCGCTCCACCTCCCACCGGTGGCGGTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     ATCTCCCTGGCGTCTGGCCCCCTCTCGAGACTTCCGCTCCACCTCCCACCGGTGGCGGTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     ATCTCCCTGGCGTCTGGCCCCCTCTCGAGACTTCCGCTCCACCTCCCACCGGTGGCGGTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     ATCTCCCTGGCGTCTGGCCCCCTCTCGAGACTTCCGCTCCACCTCCCACCGGTGGCGGTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     ATCTCCCTGGCGTCTGGCCCCCTCTCGAGACTTCCGCTCCACCTCCCACCGGTGGCGGTT
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     ATCTCCCTGGCGTCTGGCCCCCTCTCGAGACTTCCGCTCCACCTCCCACCGGTGGCGGTT
                        ************************************************************
```

FIG. 1g

```
P-ANDge.Ubq1-1:1:9      TCCAAGTCCGTTCCGCCTCCTCTCACACGGCACGAAACCGTGACGGGCACCGGCAGCACG
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      TCCAAGTCCGTTCCGCCTCCTCTCACACGGCACGAAACCGTGACGGGCACCGGCAGCACG
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     TCCAAGTCCGTTCCGCCTCCTCTCACACGGCACGAAACCGTGACGGGCACCGGCAGCACG
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     TCCAAGTCCGTTCCGCCTCCTCTCACACGGCACGAAACCGTGACGGGCACCGGCAGCACG
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     TCCAAGTCCGTTCCGCCTCCTCTCACACGGCACGAAACCGTGACGGGCACCGGCAGCACG
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     TCCAAGTCCGTTCCGCCTCCTCTCACACGGCACGAAACCGTGACGGGCACCGGCAGCACG
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     TCCAAGTCCGTTCCGCCTCCTCTCACACGGCACGAAACCGTGACGGGCACCGGCAGCACG
                        ************************************************************

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      GGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCCCTTTCCCTTCCTCTCCCGCCGCTATAAATAGC
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      GGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCCCTTTCCCTTCCTCTCCCGCCGCTATAAATAGC
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     GGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCCCTTTCCCTTCCTCTCCCGCCGCTATAAATAGC
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     GGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCCCTTTCCCTTCCTCTCCCGCCGCTATAAATAGC
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     GGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCCCTTTCCCTTCCTCTCCCGCCGCTATAAATAGC
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     GGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCCCTTTCCCTTCCTCTCCCGCCGCTATAAATAGC
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     GGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCCCTTTCCCTTCCTCTCCCGCCGCTATAAATAGC
                        ************************************************************

P-ANDge.Ubq1-1:1:9      CAGCCCCATCCCCAGCTTCTTTC
P-ANDge.Ubq1-1:1:8      CAGCCCCATCCCCAGCTTCTTTC
P-ANDge.Ubq1-1:1:11     CAGCCCCATCCCCAGCTTCTTTC
P-ANDge.Ubq1-1:1:12     CAGCCCCATCCCCAGCTTCTTTC
P-ANDge.Ubq1-1:1:13     CAGCCCCATCCCCAGCTTCTTTC
P-ANDge.Ubq1-1:1:14     CAGCCCCATCCCCAGCTTCTTTC
P-ANDge.Ubq1-1:1:10     CAGCCCCATCCCCAGCTTCTTTC
                        ***********************
```

FIG. 1h

```
P-ERIra.Ubq1-1:1:9      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     GTGGCCAGCTTTTGTTCTAGTTCAACGGCCCCGGCCTTCCGGGCACCTAATACCCTAATT
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     AATCTATTGCAGCTAACCTCAAAAGAAATGCATTTGCAGTTGTCTGTCCCAATCAATCTA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     CTAGCAGACTTACATTATAGATGGAGGAAATTAAATTCAGCCTTTGACGTGGATGCAACA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     ACTGCACTGCACAGGATACCATCTTAGCCGTTGTGTCAAAGTTTGCTTTGCTAAACGTTT
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TGAGAAAACCAGCTTTGACCAACGCGAGATGAGCGCCTTACGTTTGGCACAATGTAATGT
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     AATCCGGCACGGCAAGTTAGACTCTGTAGTGTTAGCCGGCCTCTTTACGTTTGGCATAGT
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
```

FIG. 2a

```
P-ERIra.Ubq1-1:1:9      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TTAATTGAATCCGGCATGGCAAGTTAGACCGTAGTGTGAGCCGGCCAACGCAAGTTATTA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      --------GTATAAGAGCAAGTGTATTGTCACGTGATATTTATGTTGAGATGAAGAAGAG
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TGACATATGTATAAGAGCAAGTGTATTGTCACGTGATATTTATGTTGAGATGAAGAAGAG
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      AAAATAAACAGCCTGCAAATTTATAGCGAGTGATAGATGGGCACAAGGCTTCCTATTTCT
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     AAAATAAACAGCCTGCAAATTTATAGCGAGTGATAGATGGGCACAAGGCTTCCTATTTCT
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      TAAATCAGACTTTGTAAGAACAAAAAAAGGACTTATAAGAGAATGGGATAAACCATATAT
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TAAATCAGACTTTGTAAGAACAAAAAAAGGACTTATAAGAGAATGGGATAAACCATATAT
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------- ----------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      CAATGGTGTAGTATGTTAGTATGCATTAAGATCTGACTATTATATGAGTGAGTTGTTAAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     CAATGGTGTAGTATGTTAGTATGCATTAAGATCTGACTATTATATGAGTGAGTTGTTAAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      TTCATTTTAGGTGACATGGCCCGGTTAAATTATTAGCCATACCCTAACAGCTCTAAAAAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TTCATTTTAGGTGACATGGCCCGGTTAAATTATTAGCCATACCCTAACAGCTCTAAAAAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
```

FIG. 2b

```
P-ERIra.Ubq1-1:1:9      GATATATTCGTTGAGGCACTTTTATGCAACCACATAGTCAACTTGAATGCCGCTTGAGTG
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     GATATATTCGTTGAGGCACTTTTATGCAACCACATAGTCAACTTGAATGCCGCTTGAGTG
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      CGTTCTCAAGTTTTTTTTCTTGCAAATTACGCTTTTTTAAGAAAGTATAATTTGGATCGT
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     CGTTCTCAAGTTTTTTTTCTTGCAAATTACGCTTTTTTAAGAAAGTATAATTTGGATCGT
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      GCGATTTTTTTTCTCTAGGTGTGCGTGACTGTGTGAGTAACAATTTTGGATCTCAGAAAG
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     GCGATTTTTTTTCTCTAGGTGTGCGTGACTGTGTGAGTAACAATTTTGGATCTCAGAAAG
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      GTAATAAAAGAATAATACTGCTGCCTACTTTGAGGATTACAATATCTTTCTCTAAAATGT
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     GTAATAAAAGAATAATACTGCTGCCTACTTTGAGGATTACAATATCTTTCTCTAAAATGT
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ----------------CTGCTGCCTACTTTGAGGATTACAATATCTTTCTCTAAAATGT
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      TTTGGTTTGTTATTTAAACCGTCTTTAAGGCCAATTGCTCAAGATTCATTCAACAATTGA
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TTTGGTTTGTTATTTAAACCGTCTTTAAGGCCAATTGCTCAAGATTCATTCAACAATTGA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     TTTGGTTTGTTATTTAAACCGTCTTTAAGGCCAATTGCTCAAGATTCATTCAACAATTGA
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      AACGTCTCACATGATTAAATCATATAAGGTTGCTAAGGTCTTGTTTGACAAGGTTTTTTT
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     AACGTCTCACATGATTAAATCATATAAGGTTGCTAAGGTCTTGTTTGACAAGGTTTTTTT
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     AACGTCTCACATGATTAAATCATATAAGGTTGCTAAGGTCTTGTTTGACAAGGTTTTTTT
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
```

FIG. 2c

```
P-ERIra.Ubq1-1:1:9      TGTGGAAATTTCATCTAAATTTTTGAGTGAAACTATCAAATACTAATTTAAAAAAGGCAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TGTGGAAATTTCATCTAAATTTTTGAGTGAAACTATCAAATACTAATTTAAAAAAGGCAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     TGTGGAAATTTCATCTAAATTTTTGAGTGAAACTATCAAATACTAATTTAAAAAAGGCAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      ATTTTGCTGGAGGACACTGCAGAAACGTGTAATTGGCCGGCACAAACCGCCAAACGGAGA
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     ATTTTGCTGGAGGACACTGCAGAAACGTGTAATTGGCCGGCACAAACCGCCAAACGGAGA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ATTTTGCTGGAGGACACTGCAGAAACGTGTAATTGGCCGGCACAAACCGCCAAACGGAGA
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      ATTTGCCCAGTACCATTATAAATTCATGATAAATTCATGGTTGTTTGCCAGTGGGGCTAG
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     ATTTGCCCAGTACCATTATAAATTCATGATAAATTCATGGTTGTTTGCCAGTGGGGCTAG
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ATTTGCCCAGTACCATTATAAATTCATGATAAATTCATGGTTGTTTGCCAGTGGGGCTAG
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      GGTTCCTCGCGTATGGTGCGGAATGTGGTTTGGTTCGACCAACTCGAACTCAATCCGATC
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     GGTTCCTCGCGTATGGTGCGGAATGTGGTTTGGTTCGACCAACTCGAACTCAATCCGATC
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     GGTTCCTCGCGTATGGTGCGGAATGTGGTTTGGTTCGACCAACTCGAACTCAATCCGATC
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      CAAAGGGGCATCAATAGTCATTTTAGAAAGTTTCTCTCTCCCGAGCAGTGGAAATGATTA
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     CAAAGGGGCATCAATAGTCATTTTAGAAAGTTTCTCTCTCCCGAGCAGTGGAAATGATTA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     CAAAGGGGCATCAATAGTCATTTTAGAAAGTTTCTCTCTCCCGAGCAGTGGAAATGATTA
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      TTCTATTTGGCGCGATGTCCACCGGCAAACAACCACGAATTTGTAATGGTACTAGGCAAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TTCTATTTGGCGCGATGTCCACCGGCAAACAACCACGAATTTGTAATGGTACTAGGCAAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ------------------CCACCGGCAAACAACCACGAATTTGTAATGGTACTAGGCAAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     TTCTATTTGGCGCGATGTCCACCGGCAAACAACCACGAATTTGTAATGGTACTAGGCAAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
```

FIG. 2d

```
P-ERIra.Ubq1-1:1:9      TTCTCCGTTTGGCGGTGTGTCCCGGCCAATTACACGTTTTTGCGGTGTCCTCCGACAAAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TTCTCCGTTTGGCGGTGTGTGCCGGCCAATTACACGTTTTTGCGGTGTCCTCCGACAAAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      TTCTCCGTTTGGCGGTGTGTGCCGGCCAATTACACGTTTTTGCGGTGTCCTCCGACAAAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     TTCTCCGTTTGGCGGTGTGTGCCGGCCAATTACACGTTTTTGCGGTGTCCTCCGACAAAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      TTTGCCTTTTAAAAACAATTTTATAAGAGAAGCTCCGGAGATAAAAGGCCGTCAATGTTA
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TTTGCCTTTTAAAAACAATTTTATAAGAGAAGCTCCGGAGATAAAAGGCCGTCAATGTTA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      TTTGCCTTTTAAAAACAATTTTATAAGAGAAGCTCCGGAGATAAAAGGCCGTCAATGTTA
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     TTTGCCTTTTAAAAACAATTTTATAAGAGAAGCTCCGGAGATAAAAGGCCGTCAATGTTA
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      CAAGAGTGAAGTCGTCTACTCCCTCCATCCCAAAAAATGTAATTCTAAGTATGAGTTGTA
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     CAAGAGTGAAGTCGTCTACTCCCTCCATCCCAAAAAATGTAATTCTAAGTATGAGTTGTA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      CAAGAGTGAAGTCGTCTACTCCCTCCATCCCAAAAAATGTAATTCTAAGTATGAGTTGTA
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     CAAGAGTGAAGTCGTCTACTCCCTCCATCCCAAAAAATGTAATTCTAAGTATGAGTTGTA
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ------------------------------------------------------------
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      TTATTATTTTTGGACAAAAGGAGTATACCACAAGAATGATATCATCGTCATGCTTAGATC
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TTATTATTTTTGGACAAAAGGAGTATACCACAAGAATGATATCATCGTCATGCTTAGATC
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      TTATTATTTTTGGACAAAAGGAGTATACCACAAGAATGATATCATCGTCATGCTTAGATC
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     TTATTATTTTTGGACAAAAGGAGTATACCACAAGAATGATATCATCGTCATGCTTAGATC
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ---------------------------ACCACAAGAATGATATCATCGTCATGCTTAGATC
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      CTTTTTAGTAAAGCTTGAGCTTCTCTAAAAGTAGAGAAATTAGAAAAAAATCACGTTTTT
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     CTTTTTAGTAAAGCTTGAGCTTCTCTAAAAGTAGAGAAATTAGAAAAAAATCACGTTTTT
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      CTTTTTAGTAAAGCTTGAGCTTCTCTAAAAGTAGAGAAATTAGAAAAAAATCACGTTTTT
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     CTTTTTAGTAAAGCTTGAGCTTCTCTAAAAGTAGAGAAATTAGAAAAAAATCACGTTTTT
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     CTTTTTAGTAAAGCTTGAGCTTCTCTAAAAGTAGAGAAATTAGAAAAAAATCACGTTTTT
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      GTGGTCTTGATTTCTAGCCTCCACAAAATCTTTGGTTTTACATTTTTTGTTTGATTTTGG
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     GTGGTCTTGATTTCTAGCCTCCACAAAATCTTTGGTTTTACATTTTTTGTTTGATTTTGG
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      GTGGTCTTGATTTCTAGCCTCCACAAAATCTTTGGTTTTACATTTTTTGTTTGATTTTGG
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     GTGGTCTTGATTTCTAGCCTCCACAAAATCTTTGGTTTTACATTTTTTGTTTGATTTTGG
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     GTGGTCTTGATTTCTAGCCTCCACAAAATCTTTGGTTTTACATTTTTTGTTTGATTTTGG
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------
```

FIG. 2e

```
P-ERIra.Ubq1-1:1:9      TTTCAGAAGTCCTTATTTATATGTGCTAGTTTGGCAGCACTTAAAATCGTTAGAGAGAGC
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TTTCAGAAGTCCTTATTTATATGTGCTAGTTTGGCAGCACTTAAAATCGTTAGAGAGAGC
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      TTTCAGAAGTCCTTATTTATATGTGCTAGTTTGGCAGCACTTAAAATCGTTAGAGAGAGC
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     TTTCAGAAGTCCTTATTTATATGTGCTAGTTTGGCAGCACTTAAAATCGTTAGAGAGAGC
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     TTTCAGAAGTCCTTATTTATATGTGCTAGTTTGGCAGCACTTAAAATCGTTAGAGAGAGC
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      CTAAACAAAAGCCTTTTCAAAACGACCTTGAGCCAGATTGGTTGATGGCCAAAATTTGAT
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     CTAAACAAAAGCCTTTTCAAAACGACCTTGAGCCAGATTGGTTGATGGCCAAAATTTGAT
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      CTAAACAAAAGCCTTTTCAAAACGACCTTGAGCCAGATTGGTTGATGGCCAAAATTTGAT
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     CTAAACAAAAGCCTTTTCAAAACGACCTTGAGCCAGATTGGTTGATGGCCAAAATTTGAT
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     CTAAACAAAAGCCTTTTCAAAACGACCTTGAGCCAGATTGGTTGATGGCCAAAATTTGAT
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ------------------------------------------------------------

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      TGTCAAAACTTAGGCAAGCCAAGATTTTAGCAGCTATTTGGTTTGGTACCAAAATTTGCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TGTCAAAACTTAGGCAAGCCAAGATTTTAGCAGCTATTTGGTTTGGTACCAAAATTTGCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      TGTCAAAACTTAGGCAAGCCAAGATTTTAGCAGCTATTTGGTTTGGTACCAAAATTTGCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     TGTCAAAACTTAGGCAAGCCAAGATTTTAGCAGCTATTTGGTTTGGTACCAAAATTTGCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     TGTCAAAACTTAGGCAAGCCAAGATTTTAGCAGCTATTTGGTTTGGTACCAAAATTTGCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     -----------AGGCAAGCCAAGATTTTAGCAGCTATTTGGTTTGGTACCAAAATTTGCC
                                  **************************************************

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      AATGATCTGTTCTTTTGCCTTTTCAACCGGTTTATCAGCCGTACTTCAGCTTATTCTCTC
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     AATGATCTGTTCTTTTGCCTTTTCAACCGGTTTATCAGCCGTACTTCAGCTTATTCTCTC
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      AATGATCTGTTCTTTTGCCTTTTCAACCGGTTTATCAGCCGTACTTCAGCTTATTCTCTC
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     AATGATCTGTTCTTTTGCCTTTTCAACCGGTTTATCAGCCGTACTTCAGCTTATTCTCTC
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     AATGATCTGTTCTTTTGCCTTTTCAACCGGTTTATCAGCCGTACTTCAGCTTATTCTCTC
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     AATGATCTGTTCTTTTGCCTTTTCAACCGGTTTATCAGCCGTACTTCAGCTTATTCTCTC
                        ************************************************************

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      TCACAGAACACTATTGAATCAGCCGAAAAGCCACCGCAGAACAGGACCAGTATCTCACAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TCACAGAACACTATTGAATCAGCCGAAAAGCCACCGCAGAACAGGACCAGTATCTCACAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      TCACAGAACACTATTGAATCAGCCGAAAAGCCACCGCAGAACAGGACCAGTATCTCACAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     TCACAGAACACTATTGAATCAGCCGAAAAGCCACCGCAGAACAGGACCAGTATCTCACAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     TCACAGAACACTATTGAATCAGCCGAAAAGCCACCGCAGAACAGGACCAGTATCTCACAA
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     TCACAGAACACTATTGAATCAGCCGAAAAGCCACCGCAGAACAGGACCAGTATCTCACAA
                        ************************************************************

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      ATGGCATGCCAAATATACTCACCGTCAGTGAGCCCGTTTAACGGCGTCGACAAGTCTAAC
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     ATGGCATGCCAAATATACTCACCGTCAGTGAGCCCGTTTAACGGCGTCGACAAGTCTAAC
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ATGGCATGCCAAATATACTCACCGTCAGTGAGCCCGTTTAACGGCGTCGACAAGTCTAAC
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ATGGCATGCCAAATATACTCACCGTCAGTGAGCCCGTTTAACGGCGTCGACAAGTCTAAC
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ATGGCATGCCAAATATACTCACCGTCAGTGAGCCCGTTTAACGGCGTCGACAAGTCTAAC
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ATGGCATGCCAAATATACTCACCGTCAGTGAGCCCGTTTAACGGCGTCGACAAGTCTAAC
                        ************************************************************
```

FIG. 2f

```
P-ERIra.Ubq1-1:1:9      GGCCACCAACCAGCGAACCACCAGCGTCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGACGGCCGAGACG
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     GGCCACCAACCAGCGAACCACCAGCGTCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGACGGCCGAGACG
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      GGCCACCAACCAGCGAACCACCAGCGTCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGACGGCCGAGACG
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     GGCCACCAACCAGCGAACCACCAGCGTCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGACGGCCGAGACG
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     GGCCACCAACCAGCGAACCACCAGCGTCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGACGGCCGAGACG
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     GGCCACCAACCAGCGAACCACCAGCGTCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGACGGCCGAGACG
                        ************************************************************

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      TTGACACCTTGGCGCGGGCATCTCTCTGGCCCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCTCCAC
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TTGACACCTTGGCGCGGGCATCTCTCTGGCCCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCTCCAC
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      TTGACACCTTGGCGCGGGCATCTCTCTGGCCCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCTCCAC
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     TTGACACCTTGGCGCGGGCATCTCTCTGGCCCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCTCCAC
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     TTGACACCTTGGCGCGGGCATCTCTCTGGCCCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCTCCAC
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     TTGACACCTTGGCGCGGGCATCTCTCTGGCCCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCTCCAC
                        ************************************************************

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      TGGTGGCGGTTTCCAAGTCCGTTCCGCCTCCTGCTCCTCCTCACACGGCACGAAACCGTC
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     TGGTGGCGGTTTCCAAGTCCGTTCCGCCTCCTGCTCCTCCTCACACGGCACGAAACCGTC
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      TGGTGGCGGTTTCCAAGTCCGTTCCGCCTCCTGCTCCTCCTCACACGGCACGAAACCGTC
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     TGGTGGCGGTTTCCAAGTCCGTTCCGCCTCCTGCTCCTCCTCACACGGCACGAAACCGTC
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     TGGTGGCGGTTTCCAAGTCCGTTCCGCCTCCTGCTCCTCCTCACACGGCACGAAACCGTC
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     TGGTGGCGGTTTCCAAGTCCGTTCCGCCTCCTGCTCCTCCTCACACGGCACGAAACCGTC
                        ************************************************************

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      ACGGCACCGGCAGCACGGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCCCTTTCCCTTCCTCGCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     ACGGCACCGGCAGCACGGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCCCTTTCCCTTCCTCGCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      ACGGCACCGGCAGCACGGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCCCTTTCCCTTCCTCGCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     ACGGCACCGGCAGCACGGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCCCTTTCCCTTCCTCGCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     ACGGCACCGGCAGCACGGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCCCTTTCCCTTCCTCGCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     ACGGCACCGGCAGCACGGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCCCTTTCCCTTCCTCGCC
                        ************************************************************

P-ERIra.Ubq1-1:1:9      CGCCGTTTTAAATAGCCAGCCCCATCCCCAGCTTCTCTCCCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:10     CGCCGTTTTAAATAGCCAGCCCCATCCCCAGCTTCTCTCCCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:8      CGCCGTTTTAAATAGCCAGCCCCATCCCCAGCTTCTCTCCCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:11     CGCCGTTTTAAATAGCCAGCCCCATCCCCAGCTTCTCTCCCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:12     CGCCGTTTTAAATAGCCAGCCCCATCCCCAGCTTCTCTCCCC
P-ERIra.Ubq1-1:1:13     CGCCGTTTTAAATAGCCAGCCCCATCCCCAGCTTCTCTCCCC
                        ******************************************
```

FIG. 2g

```
P-Sv.Ubq1-1:1:2     ----------------------------------------------------------
P-Sv.Ubq1-1:1:1     ACTGCCGCGACACGCCTCACTGGCGGGAGGGCTCCGAGCGCTCTCTCCCCGGCGGCCGGC
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ----------------------------------------------------------

P-Sv.Ubq1-1:1:2     ----------------------------------------------------------
P-Sv.Ubq1-1:1:1     GGAGCAGCGATCTGGATTGGAGAGAATAGAGGAAAGAGAGGGAAAAGGAGAGAGATAGCG
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ----------------------------------------------------------

P-Sv.Ubq1-1:1:2     ----------------------------------------------------------
P-Sv.Ubq1-1:1:1     CAAAGAGCTGAAAAGATAAGGTTGTGCGGGCTGTGGTGATTAGAGGACCACTAATCCCTC
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ----------------------------------------------------------

P-Sv.Ubq1-1:1:2     ----------------------------------------------------------
P-Sv.Ubq1-1:1:1     CATCTCCTAATGACGCGGTGCCCAAGACCAGTGCCGCGGCACACCAGCGTCTAAGTGAAC
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ----------------------------------------------------------

P-Sv.Ubq1-1:1:2     ----------------------------------------------------------
P-Sv.Ubq1-1:1:1     TTCCGCTAACCTTCCGGTCATTGCGCCTGAAAGATGTCATGTGGCGAGGCCCCCCTCTCA
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ----------------------------------------------------------

P-Sv.Ubq1-1:1:2     ----------------------------------------------------------
P-Sv.Ubq1-1:1:1     GTAGATTGCCAACTGCCTACCGTGCCACTCTTCCATGCATGATTGCTCCCGTCTATCCCG
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ----------------------------------------------------------

P-Sv.Ubq1-1:1:2     ----------------------------------------------------------
P-Sv.Ubq1-1:1:1     TTTCTCACAACAGATAGACAACAGTAAGCATCACTAAAGCAAGCATGTGTAGAACCTTAA
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ----------------------------------------------------------

P-Sv.Ubq1-1:1:2     ----------------------------------GCCGTTTTTGAAGTATCCAGGA
P-Sv.Ubq1-1:1:1     AAAAAGGCTTATACTACCAGTATACTATCAACCAGCATGCCGTTTTTGAAGTATCCAGGA
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ----------------------------------------------------------

P-Sv.Ubq1-1:1:2     TTAGAAGCTTCTACTGCGCTTTTATATTATAGCTGTGGACCTGTGGTAACCTTTCTCTTT
P-Sv.Ubq1-1:1:1     TTAGAAGCTTCTACTGCGCTTTTATATTATAGCTGTGGACCTGTGGTAACCTTTCTCTTT
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ----------------------------------------------------------

P-Sv.Ubq1-1:1:2     TGGCGCTTGCTTAATCTCGGCCGTGCTGGTCCATGCTTAGGCACTAGGCAGAGATAGAGC
P-Sv.Ubq1-1:1:1     TGGCGCTTGCTTAATCTCGGCCGTGCTGGTCCATGCTTAGGCACTAGGCAGAGATAGAGC
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ----------------------------------------------------------

P-Sv.Ubq1-1:1:2     CGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTCGAGGGGCCGTGGGCTGGTTTCCACTAGC
P-Sv.Ubq1-1:1:1     CGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTCGAGGGGCCGTGGGCTGGTTTCCACTAGC
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ----------------------------------------------------------

P-Sv.Ubq1-1:1:2     CTACAGCTGTGCCACGTGCGGCCGCGCAAGCCGAAGCAAGCACGCTGAGCCGTTGGACAG
P-Sv.Ubq1-1:1:1     CTACAGCTGTGCCACGTGCGGCCGCGCAAGCCGAAGCAAGCACGCTGAGCCGTTGGACAG
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ----------------------------------------------------------
```

FIG. 3a

```
P-Sv.Ubq1-1:1:2     CTTGTCATAATGCCATTACGTCGATTACAGGTAACTGGCCCTGTAACTACTCGTTCGGCC
P-Sv.Ubq1-1:1:1     CTTGTCATAATGCCATTACGTGGATTACAGGTAACTGGCCCTGTAACTACTCGTTCGGCC
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ------------------------------------------------------------

P-Sv.Ubq1-1:1:2     ATCATCAAACGACGACGTCCGCTAGGCGACGACACGGGTAATGCACGCAGCCACCCAGGC
P-Sv.Ubq1-1:1:1     ATCATCAAACGACGACGTCCGCTAGGCGACGACACGGGTAATGCACGCAGCCACCCAGGC
P-Sv.Ubq1-1:1:3     --------------------------------CACGGGTAATGCACGCAGCCACCCAGGC
                                                     ****************************

P-Sv.Ubq1-1:1:2     GCGCGCGCTAGCGGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTCGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG
P-Sv.Ubq1-1:1:1     GCGCGCGCTAGCGGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTCGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG
P-Sv.Ubq1-1:1:3     GCGCGCGCTAGCGGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTCGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG
                    ************************************************************

P-Sv.Ubq1-1:1:2     GGTTAACGCCAGAAACAGTGTTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAAATATTCACACGA
P-Sv.Ubq1-1:1:1     GGTTAACGCCAGAAACAGTGTTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAAATATTCACACGA
P-Sv.Ubq1-1:1:3     GGTTAACGCCAGAAACAGTGTTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAAATATTCACACGA
                    ************************************************************

P-Sv.Ubq1-1:1:2     AAGAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAAACTCACGCCCGCTA
P-Sv.Ubq1-1:1:1     AAGAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAAACTCACGCCCGCTA
P-Sv.Ubq1-1:1:3     AAGAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAAACTCACGCCCGCTA
                    ************************************************************

P-Sv.Ubq1-1:1:2     ACATCCAACGGCCAACAGCTCGACGTGCCGGTCAGCAGAGACATCGGAACACTGGTGATT
P-Sv.Ubq1-1:1:1     ACATCCAACGGCCAACAGCTCGACGTGCCGGTCAGCAGAGACATCGGAACACTGGTGATT
P-Sv.Ubq1-1:1:3     ACATCCAACGGCCAACAGCTCGACGTGCCGGTCAGCAGAGACATCGGAACACTGGTGATT
                    ************************************************************

P-Sv.Ubq1-1:1:2     GGTGGAGCCGGCAGTATGCGCCCCAGCACGGCCGAGGTGGTGGTGGCCCGTGGCCCTGCT
P-Sv.Ubq1-1:1:1     GGTGGAGCCGGCAGTATGCGCCCCAGCACGGCCGAGGTGGTGGTGGCCCGTGGCCCTGCT
P-Sv.Ubq1-1:1:3     GGTGGAGCCGGCAGTATGCGCCCCAGCACGGCCGAGGTGGTGGTGGCCCGTGGCCCTGCT
                    ************************************************************

P-Sv.Ubq1-1:1:2     GTCTGCGCGGCTCGGGACAACTTGAAACTGGGCCACCGCCTCGTCGCAACTCGCAACCCG
P-Sv.Ubq1-1:1:1     GTCTGCGCGGCTCGGGACAACTTGAAACTGGGCCACCGCCTCGTCGCAACTCGCAACCCG
P-Sv.Ubq1-1:1:3     GTCTGCGCGGCTCGGGACAACTTGAAACTGGGCCACCGCCTCGTCGCAACTCGCAACCCG
                    ************************************************************

P-Sv.Ubq1-1:1:2     TTGGCGGAAGAAAGGAATGGCTCGTAGGGGCCCGGGTAGAATCCAAGAATGTTGCGCTGG
P-Sv.Ubq1-1:1:1     TTGGCGGAAGAAAGGAATGGCTCGTAGGGGCCCGGGTAGAATCCAAGAATGTTGCGCTGG
P-Sv.Ubq1-1:1:3     TTGGCGGAAGAAAGGAATGGCTCGTAGGGGCCCGGGTAGAATCCAAGAATGTTGCGCTGG
                    ************************************************************

P-Sv.Ubq1-1:1:2     GCTTCGATTCACATAACATGGGCCTGAAGCTCTAAAACGACGGCCCGGTCACCGGGCGAT
P-Sv.Ubq1-1:1:1     GCTTCGATTCACATAACATGGGCCTGAAGCTCTAAAACGACGGCCCGGTCACCGGGCGAT
P-Sv.Ubq1-1:1:3     GCTTCGATTCACATAACATGGGCCTGAAGCTCTAAAACGACGGCCCGGTCACCGGGCGAT
                    ************************************************************
```

FIG. 3b

```
P-Sv.Ubq1-1:1:2     GGAAAGAGACCGGATCCTCCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACCACC
P-Sv.Ubq1-1:1:1     GGAAAGAGACCGGATCCTCCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACCACC
P-Sv.Ubq1-1:1:3     GGAAAGAGACCGGATCCTCCTTGTGAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACCACC
                    ********************* ************************************

P-Sv.Ubq1-1:1:2     GACGCGGAGGAGTCGTGCGTGGTCCAACACGGCCGGCGGGCTGGGCTGCGACCTTAACCA
P-Sv.Ubq1-1:1:1     GACGCGGAGGAGTCGTGCGTGGTCCAACACGGCCGGCGGGCTGGGCTGCGACCTTAACCA
P-Sv.Ubq1-1:1:3     GACGCGGAGGAGTCGTGCGTGGTCCAACACGGCCGGCGGGCTGGGCTGCGACCTTAACCA
                    ************************************************************

P-Sv.Ubq1-1:1:2     GCAAGGCACGCCACGACCCGCCTCGCCCTCGAGGCATAAATACCCTCCCATCC
P-Sv.Ubq1-1:1:1     GCAAGGCACGCCACGACCCGCCTCGCCCTCGAGGCATAAATACCCTCCCATCC
P-Sv.Ubq1-1:1:3     GCAAGGCACGCCACGACCCGCCTCGCCCTCGAGGCATAAATACCCTCCCATCC
                    *****************************************************
```

FIG. 3c

```
EXP-Zm.UbqM1:1:2    GTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAAGTATAAAAAATTACCACA
EXP-Zm.UbqM1:1:5    GTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAAGTATAAAAAATTACCACA
EXP-Zm.UbqM1:1:1    GTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGTTATAAAAAATTACCACA
EXP-Zm.UbqM1:1:4    GTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAGTTATAAAAAATTACCACA
                    ************************ ***************** ******************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    TA--TTTTTTTGTCACACT--TATTTGAAGTGTAGTTTATCTATCTCTATACATATATTT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    TA--TTTTTTTGTCACACT--TATTTGAAGTGTAGTTTATCTATCTCTATACATATATTT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    TATTTTTTTTTGTCACACTTGTGTTTGAAGTGCAGTTTATCTATCTCTATACATATATTT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    TA-TTTTTTTTGTCACACT--TGTTTGAAGTGCAGTTTATCTATCTTTATACATATATTT
                    **  ***************  * ********* ************* *************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    AAACTTCACTCTACAAATAATATAGTCTATAATACTAAAATAATATTAGTGTTTTAGAGG
EXP-Zm.UbqM1:1:5    AAACTTCACTCTACAAATAATATAGTCTATAATACTAAAATAATATTAGTGTTTTAGAGG
EXP-Zm.UbqM1:1:1    AAACTTCACTATATGAATAATATAGTCTATAGTATTAAAATAATATCAATGTTTTAGATG
EXP-Zm.UbqM1:1:4    AAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTGTTTTAGAGA
                    ****** *** **  ********* ****** ** ** ******** * *********

EXP-Zm.UbqM1:1:2    ATCATATAAATAAACTGCTAGACATGGTCTAAAGGATAATTGAATATTTTGACAA-----
EXP-Zm.UbqM1:1:5    ATCATATAAATAAACTGCTAGACATGGTCTAAAGGATAATTGAATATTTTGACAA-----
EXP-Zm.UbqM1:1:1    ATTATATAACTGAACTGCTAGACATGGTCTAAAGGACAACCGAGTATTTTGACAACATGA
EXP-Zm.UbqM1:1:4    ATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGA
                    ** ****** * *** * ******************** **  ** ***********

EXP-Zm.UbqM1:1:2    -TCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGATCTCTCTGTTTTTTTTGCAAATAGCTT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    -TCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGATCTCTCTGTTTTTTTTGCAAATAGCTT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    CTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTTT---TTACTTTTGCAAATAGCTT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    CTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTT-TTTTTTTTGCAAATAGCTT
                     ********************************** ***     **  ***************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    GACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGATTTAGGGTTGATGG
EXP-Zm.UbqM1:1:5    GACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGATTTAGGGTTGATGG
EXP-Zm.UbqM1:1:1    CACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTT-----------------
EXP-Zm.UbqM1:1:4    CACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGG
                     ****************************************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    TTTCTATAGACTAA--TTTTTAGTACATCCATTTTATTCT-TTTTAGTCTCTAAATTTTT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    TTTCTATAGACTAA--TTTTTAGTACATCCATTTTATTCT-TTTTAGTCTCTAAATTTTT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    ---------ACTAAA-TTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAA-TTAA
EXP-Zm.UbqM1:1:4    TTTTTATAGACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAA-TTAA
                           *****  *****-******** ********** ****** ******* **

EXP-Zm.UbqM1:1:2    TAAAACTAAAACTCTATTTTAG-TTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAATGAAATAAA
EXP-Zm.UbqM1:1:5    TAAAACTAAAACTCTATTTTAG-TTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAATGAAATAAA
EXP-Zm.UbqM1:1:1    GAAAACTTAAACTCTATTTTAG-TTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAATAGAATAAA
EXP-Zm.UbqM1:1:4    GAAAACTAAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAATAGAATAAA
                     ****** ************** ******************************  ******
```

FIG. 4a

```
EXP-Zm.UbqM1:1:2    ATAAATTGACTACAAATAAAACAAATACCCTTTAAGAAA-TAAAAAAACTAAGCAAACAT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    ATAAATTGACTACAAATAAAACAAATACCCTTTAAGAAA-TAAAAAAACTAAGCAAACAT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    ATAAAGTGACTAAAAAATAACTAAATACCTTTTAAGAAA-TAAAAAAACTAAGGAACCAT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    ATAAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAAACTAAGGAAACAT
                    ***** ****** ***  **  ******* ********* ************* ** ***

EXP-Zm.UbqM1:1:2    TTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGACAGGCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGAC
EXP-Zm.UbqM1:1:5    TTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGACAGGCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGAC
EXP-Zm.UbqM1:1:1    TTTTCTTGTTCCGAGTAGATAATGACAGCCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGAC
EXP-Zm.UbqM1:1:4    TTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGAC
                    ********** ************* *** ***** ************************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    ACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTC
EXP-Zm.UbqM1:1:5    ACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTC
EXP-Zm.UbqM1:1:1    ACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTC
EXP-Zm.UbqM1:1:4    ACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTC
                    ************************************************************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    TGTAGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    TGTAGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    TGTAGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    TGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGT
                    *** ********************************************************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    CGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGGCGGCACGGCAGGCGGCCTCT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    CGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGGCGGCACGGCAGGCGGCCTCT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    CGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGG-----
EXP-Zm.UbqM1:1:4    CGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCC
                    ****************************************** ***************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    TCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCGCTTTC
EXP-Zm.UbqM1:1:5    TCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCGCTTTC
EXP-Zm.UbqM1:1:1    -CCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCGCTTTC
EXP-Zm.UbqM1:1:4    TCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCGCTTTC
                     ********************************************************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    CCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCCTCCACACCCTCTTTCCCCAACCTCGT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    CCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCCTCCACACCCTCTTTCCCCAACCTCGT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    CCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAG--ACCCCCTCCACACCCTCTTTCCCCAACCTCGT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    CCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCCTCCACACCTTCTTTCCCCAACCTCGT
                    *************************  ************** ******************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    GTTCGTTCGGAGCGCACACACACGCAACCAGATCTCCCCCAAATCCAGCCGTCGGCACCT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    GTTCGTTCGGAGCGCACACACACGCAACCAGATCTCCCCCAAATCCAGCCGTCGGCACCT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    GTTCGTTCGGAGCGCGCACACACACAACCAGATCTCCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    GTT-GTTCGGAGCGCACACACACACAACCAGATCTCCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCT
                    *** *********** ******* ************************ ************
```

FIG. 4b

```
EXP-Zm.UbqM1:1:2    CCGCTTCAAGGTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCCCCTCTCTCTACCTTCTCTAGATCGG
EXP-Zm.UbqM1:1:5    CCGCTTCAAGGTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCCCCTCTCTCTACCTTCTCTAGATCGG
EXP-Zm.UbqM1:1:1    CCGCTTCAAGGTACGCCGCTCATCCTCCTCCCCCCCCCTCTCTCTACCTTCTCTAGATCGG
EXP-Zm.UbqM1:1:4    CCGCTTCAAGGTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCC---CTCTCTACCTTCTCTAGATCGG
                    ***************************** ******   **********************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    CGATCCGGTCCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTTGTGTTAGAGCA
EXP-Zm.UbqM1:1:5    CGATCCGGTCCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTTGTGTTAGAGCA
EXP-Zm.UbqM1:1:1    CGTTTCGGTCCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTTGTGTTAGATC-
EXP-Zm.UbqM1:1:4    CGTTCCGGTCCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTTGTGTTAGATC-
                    ** * ********************************************************* *

EXP-Zm.UbqM1:1:2    AACATGTTCATGTT-----------------------CATGTTTGTGAT----------
EXP-Zm.UbqM1:1:5    AACATGTTCATGTT-----------------------CATGTTTGTGAT----------
EXP-Zm.UbqM1:1:1    --CGTGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGATTTCGTACACGGATGCGACCTGTACATCA
EXP-Zm.UbqM1:1:4    --CGTGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCA
                      * ****  ****                          ** *  ** **

EXP-Zm.UbqM1:1:2    GATGTGGTCTGGTTG-------GGCGGTCGTTCTAGATCGGAG----TAGGATACTGTTT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    GATGTGGTCTGGTTG-------GGCGGTCGTTCTAGATCGGAG----TAGGATACTGTTT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    GACATGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGGGGAATCCTGGGA---TGGCT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    GACACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGGGGAATCCTGGGA---TGGCT
                    **   * **** ***       * * **  ****   * **       * ***   **  *

EXP-Zm.UbqM1:1:2    CAAGCT---------ACCTGGTGGATTT-----ATTAATTTTGTATCTGTATGT------
EXP-Zm.UbqM1:1:5    CAAGCT---------ACCTGGTGGATTT-----ATTAATTTTGTATCTGTATGT------
EXP-Zm.UbqM1:1:1    CTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTTCATGAATTTTTTTTGTTTCGTTGCATAGGGTT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    CTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTTCATG-ATTTTTTTTGTTTCGTTGCATAGGGTT
                    * ***          **  * * *****     ***  ****** **  *   *

EXP-Zm.UbqM1:1:2    --GTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTA
EXP-Zm.UbqM1:1:5    --GTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTA
EXP-Zm.UbqM1:1:1    TGGTTTGCCCTTTTCCTTTAT---------TTCAATAT-----------ATGCC------
EXP-Zm.UbqM1:1:4    TGGTTTGCCCTTTTCCTTTAT---------TTCAATAT-----------ATGCC------
                      ** **** *    *** **         ** ** **           **  *

EXP-Zm.UbqM1:1:2    GGATAGGTATACATGTTGATGCGGGT--TTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTTT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    GGATAGGTATACATGTTGATGCGGGT--TTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTTT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    ------GTGCACTTGTTTGT-CGGGTCATCTTTTCATG----------------TTTTTT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    ------GTGCACTTGTTTGT-CGGGTCATCTTTTCATGC---------------TTTTTT
                          **  ** **** * ***** * *  * ***                 ******

EXP-Zm.UbqM1:1:2    CTCGCTTGGTTGTGATGATATGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATAC
EXP-Zm.UbqM1:1:5    CTCGCTTGGTTGTGATGATATGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATAC
EXP-Zm.UbqM1:1:1    TTGGCTTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATAC
EXP-Zm.UbqM1:1:4    TTGCTTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGAAGAATTC
                     *  *************** ********************************** ***** *
```

FIG. 4c

```
EXP-Zm.UbqM1:1:2    TGTTTCAAACTACCTGGTGGATTTATTAAAGGATAAAGGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGA
EXP-Zm.UbqM1:1:5    TGTTTCAAACTACCTGGTGGATTTATTAAAGGATAAAGGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGA
EXP-Zm.UbqM1:1:1    TGTTTCAAACTACCTGGTGGATTTATTAA------------------------------
EXP-Zm.UbqM1:1:4    TGTTTCAAACTACCTGGTGGATTTATTAA------------------------------
                    ****************************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    ATACTGTTTCAAACTACCTGGTGGATTTATTAAAGGATCTGTATGTATGTGCC-TACATC
EXP-Zm.UbqM1:1:5    ATACTGTTTCAAACTACCTGGTGGATTTATTAAAGGATCTGTATGTATGTGCC-TACATC
EXP-Zm.UbqM1:1:1    --------------------------------AGGATCTGTATGTATGTGCCATACATC
EXP-Zm.UbqM1:1:4    ------------------------------TTTTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATA
                                                    ************ ****** *****

EXP-Zm.UbqM1:1:2    TTCATAGTTACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    TTCATAGTTACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    TTCATAGTTACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    TTCATAGTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT
                    ***********  **  ********************************************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    TGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTT-TTCGCTTGGTTGTGATGAT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    TGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTT-TTCGCTTGGTTGTGATGAT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    TGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTTTTCGCTTGGTTGTGATGAT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    TGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTGTTCGCTTGGTTGTGATGAT
                    ****************************************** ******************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    GTGGTCTGGTTGGGCGG--------TCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    GTGGTCTGGTTGGGCGG--------TCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    GTGGTCTGGTCGGGCGG--------TCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    GTGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCATTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACT
                    *** ****** ******        ************************************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    ACCTGGTGGATTTATTAATTTTGTATCTTTATGTGTGTGCCATACATCTTCATAGTTACG
EXP-Zm.UbqM1:1:5    ACCTGGTGGATTTATTAATTTTGTATCTTTATGTGTGTGCCATACATCTTCATAGTTACG
EXP-Zm.UbqM1:1:1    ACCTGGTGGATTTATTAATTTTGGATCTGTATGTGTGT--CATACATCTTCATAGTTACG
EXP-Zm.UbqM1:1:4    ACCTGGTGTATTTATTAATTTTGGAACTGTATGTGTGTGTCATACATCTTCATAGTTACG
                    ******** ************** * ** *********  ********************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    AGTTTAAGATGATGGATGGAAATATTGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    AGTTTAAGATGATGGATGGAAATATTGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    AGTTTAA---GATCGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    AGTTTAA---GATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTT
                    *******    *** *********** ************************************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    TACTGATGCATATACATGATGGCATATGCGGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTA
EXP-Zm.UbqM1:1:5    TACTGATGCATATACATGATGGCATATGCGGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTA
EXP-Zm.UbqM1:1:1    TACTGATGCATATAC---ATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTA
EXP-Zm.UbqM1:1:4    TACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTA
                    ***************   *********** ********************************
```

FIG. 4d

```
EXP-Zm.UbqM1:1:2    CCTATCTATTATAATAAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTGATCTTGATATACTTGGAT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    CCTATCTATTATAATAAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTGATCTTGATATACTTGGAT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    CCTATCTATTATAATAAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTGATCTTGATATACTTGGAT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    CCTATCTATTATAATAAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTGATCTTGATATACTTGGAT
                    *** ************************************************************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    GATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGA-TTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTAT
EXP-Zm.UbqM1:1:5    GATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGA-TTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTAT
EXP-Zm.UbqM1:1:1    GATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTAT
EXP-Zm.UbqM1:1:4    GATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTAT
                    **************************** ********************************

EXP-Zm.UbqM1:1:2    TTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTCCGATGCTCACCCTGTTGTTGGGTGATACTTCTGCAG
EXP-Zm.UbqM1:1:5    TTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTCCGATGCTCACCCTGTTGTTTGGTGATACTTCTGCAG
EXP-Zm.UbqM1:1:1    TTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGT-CGATGCTCACCCTGTTGTTTGGTGATACTTCTGCAG
EXP-Zm.UbqM1:1:4    TTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGT-CGATGCTCACCCTGTTGTTTGGTGATACTTCTGCAG
                    ********************** ******************* ****************
```

FIG. 4e

```
P-Sb.Ubq6-1:1:2     ----------------------------------------------------------
P-Sb.Ubq6-1:1:1     CATTAAAAGTCATTATGTGCATGCGTCGTAACTAACATGGATATGTTGCTGCACTATCTC

P-Sb.Ubq6-1:1:2     ----CACTAGCTGCGCATGATAAAGCCACAAGCCAAAATTAATTATTATGGGTGAGAATA
P-Sb.Ubq6-1:1:1     CTCGCACTAGCTGCGCATGATAAAGCCACAAGCCAAAATTAATTATTATGGGTGAGAATA
                        ************************************************************

P-Sb.Ubq6-1:1:2     AATACGTACCAGCACCGGCCATAGAAAAAGTACATTATTAAAGGTCTAATTTGGAAACAG
P-Sb.Ubq6-1:1:1     AATACGTACCAGCACCGGCCATAGAAAAAGTACATTATTAAAGGTCTAATTTGGAAACAG
                    ************************************************************

P-Sb.Ubq6-1:1:2     TCTGAAAACGACGTGCGCTGCAGAGGTAAATGTAATTTTCGGCACTAAAACCATTATCAA
P-Sb.Ubq6-1:1:1     TCTGAAAACGACGTGCGCTGCAGAGGTAAATGTAATTTTCGGCACTAAAACCATTATCAA
                    ************************************************************

P-Sb.Ubq6-1:1:2     CTAATTCATTCAATAACAGTTATTTAGAAAATGTATAGCTCGCTCTAAAAAAACAGTTTA
P-Sb.Ubq6-1:1:1     CTAATTCATTCAATAACAGTTATTTAGAAAATGTATAGCTCGCTCTAAAAAAACAGTTTA
                    ************************************************************

P-Sb.Ubq6-1:1:2     GAAAAACAGTCAAAATAATTCGACCAACAAACAGTTAATAAGGTTCATTAAATATATAAT
P-Sb.Ubq6-1:1:1     GAAAAACAGTCAAAATAATTCGACCAACAAACAGTTAATAAGGTTCATTAAATATATAAT
                    ************************************************************

P-Sb.Ubq6-1:1:2     GCACGGTGCTATTTGATCTTTTAAAGGAAAAAGAGGAATAGTCGTGGGCGCCAGGCGGGA
P-Sb.Ubq6-1:1:1     GCACGGTGCTATTTGATCTTTTAAAGGAAAAAGAGGAATAGTCGTGGGCGCCAGGCGGGA
                    ************************************************************

P-Sb.Ubq6-1:1:2     ATTGGGGCGCGGGAGTCTGCCGGACGACGCGTTCCGTCCGAACGGCCGGACCCGACGAGG
P-Sb.Ubq6-1:1:1     ATTGGGGCGCGGGAGTCTGCCGGACGACGCGTTCCGTCCGAACGGCCGGACCCGACGAGG
                    ************************************************************

P-Sb.Ubq6-1:1:2     CCCCCCCGCCGCCCCACGTCGCAGAACCGTCCGTGGGTGGTAATCTGGCCGGGTACACCA
P-Sb.Ubq6-1:1:1     CCCCCCCGCCGCCCCACGTCGCAGAACCGTCCGTGGGTGGTAATCTGGCCGGGTACACCA
                    ************************************************************

P-Sb.Ubq6-1:1:2     GCCGTCCCCTTGGGCGGCCTCACAGCACTGGGCTCACACGTGAGTTTTGTTCTGGGCTTC
P-Sb.Ubq6-1:1:1     GCCGTCCCCTTGGGCGGCCTCACAGCACTGGGCTCACACGTGAGTTTTGTTCTGGGCTTC
                    ************************************************************

P-Sb.Ubq6-1:1:2     GGATCGCACCATATGGGCCTCGGCATCAGAAAGACGGGGCCCGTCTGGGATAGAAGAGAC
P-Sb.Ubq6-1:1:1     GGATCGCACCATATGGGCCTCGGCATCAGAAAGACGGGGCCCGTCTGGGATAGAAGAGAC
                    ************************************************************
```

FIG. 5a

```
P-Sb.Ubq6-1:1:2     AGGAACCTCCTCGTGGATTCCAGAAGCCAGCCACGAGCGACCACCGACGCGGAGGATACT
P-Sb.Ubq6-1:1:1     AGGAACCTCCTCGTGGATTCCAGAAGCCAGCCACGAGCGACCACCGACGCGGAGGATACT
                    ************************************************************

P-Sb.Ubq6-1:1:2     CGTCGTCCAAGTCCAACACGGCGGGCGGGCGGGCGGACGCGTGGGCTGGGCTAACTGCCT
P-Sb.Ubq6-1:1:1     CGTCGTCCAAGTCCAACACGGCGGGCGGGCGGGCGGACGCGTGGGCTGGGCTAACTGCCT
                    ************************************************************

P-Sb.Ubq6-1:1:2     AACCTTAACCTCCAAGGCACGCCAAGGCCCGCTTCTCCCACCCGACATAAATATCCCCCC
P-Sb.Ubq6-1:1:1     AACCTTAACCTCCAAGGCACGCCAAGGCCCGCTTCTCCCACCCGACATAAATATCCCCCC
                    ************************************************************

P-Sb.Ubq6-1:1:2     ATCCAGGCAAGGCGC
P-Sb.Ubq6-1:1:1     ATCCAGGCAAGGCGC
                    ***************
```

FIG. 5b

```
P-SETit.Ubq1-1:1:4      ACTGCCGCGACACGCCTCACTGGCGGGAGGGCTCCGAGCGCTCTCTCCCCGGCGGCCGGC
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Ubq1-1:1:1      ACTGCCGCGACACGCCTCACTGGCGGGAGGGCTCCGAGCGCTCTCTCCCCGGCGGCCGGC
P-SETit.Ubq1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:4      GGAGCAGCGATCTGGATTGGAGAGAATAGAGGAAAGAGAGGGAAAAGGAGAGAGATAGCG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Ubq1-1:1:1      GGAGCAGCGATCTGGATTGGAGAGAATAGAGGAAAGAGAGGGAAAAGGAGAGAGATAGCG
P-SETit.Ubq1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:4      CAAAGAGCTGAAAAGATAAGGTTGTGCGGGCTGTGGTGATTAGAGGACCACTAATCCCTC
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Ubq1-1:1:1      CAAAGAGCTGAAAAGATAAGGTTGTGCGGGCTGTGGTGATTAGAGGACCACTAATCCCTC
P-SETit.Ubq1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:4      CATCTCCTAATGACGCGGTGCCCAAGACCAGTGCCGCGGCACACCAGCGTCTAAGTGAAC
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Ubq1-1:1:1      CATCTCCTAATGACGCGGTGCCCAAGACCAGTGCCGCGGCACACCAGCGTCTAAGTGAAC
P-SETit.Ubq1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:4      TTCCGCTAACCTTCCGGTCATTGCGCCTGAAAGATGTCATGTGGCGAGGCCCCCCTCTCA
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Ubq1-1:1:1      TTCCGCTAACCTTCCGGTCATTGCGCCTGAAAGATGTCATGTGGCGAGGCCCCCCTCTCA
P-SETit.Ubq1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:4      GTAGATTGCCAACTGCCTACCGTGCCACTCTTCCATGCATGATTGCTCCCGTCTATCCCG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Ubq1-1:1:1      GTAGATTGCCAACTGCCTACCGTGCCACTCTTCCATGCATGATTGCTCCCGTCTATCCCG
P-SETit.Ubq1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:4      TTTCTCACAACAGATAGACAACAGTAAGCATCACTAAAGCAAGCATGTGTAGAACCTTAA
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Ubq1-1:1:1      TTTCTCACAACAGATAGACAACAGTAAGCATCACTAAAGCAAGCATGTGTAGAACCTTAA
P-SETit.Ubq1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:4      AAAAAGGCTTATACTACCAGTATACTATCAACCAGCATGCCGTTTTTGAAGTATCCAGGA
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Ubq1-1:1:1      AAAAAGGCTTATACTACCAGTATACTATCAACCAGCATGCCGTTTTTGAAGTATCCAGGA
P-SETit.Ubq1-1:1:2      ------------------------------------GCCGTTTTTGAAGTATCCAGGA

P-SETit.Ubq1-1:1:4      TTAGAAGCTTCTACTGCGCTTTTATATTATAGCTGTGGACCCGTGGTAACCTTTCTCTTT
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Ubq1-1:1:1      TTAGAAGCTTCTACTGCGCTTTTATATTATAGCTGTGGACCTGTGGTAACCTTTCTCTTT
P-SETit.Ubq1-1:1:2      TTAGAAGCTTCTACTGCGCTTTTATATTATAGCTGTGGACCTGTGGTAACCTTTCTCTTT

P-SETit.Ubq1-1:1:4      TGGCGCTTGCTTAATCTCGGCCGTGCTGGTCCATGCTTAGGCACTAGGCAGAGATAGAGC
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Ubq1-1:1:1      TGGCGCTTGCTTAATCTCGGCCGTGCTGGTCCATGCTTAGGCACTAGGCAGAGATAGAGC
P-SETit.Ubq1-1:1:2      TGGCGCTTGCTTAATCTCGGCCGTGCTGGTCCATGCTTAGGCACTAGGCAGAGATAGAGC
```

FIG. 6a

```
P-SETit.Ubq1-1:1:4      CGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTCGAGGGGCCGTGGGCTGGTTTCCACTAGC
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Ubq1-1:1:1      CGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTCGAGGGGCCGTGGGCTGGTTTCCACTAGC
P-SETit.Ubq1-1:1:2      CGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTCGAGGGGCCGTGGGCTGGTTTCCACTAGC

P-SETit.Ubq1-1:1:4      CTACAGCTGTGCCACGTGCGGCCGCGCAAGCCGAAGCAAGCACGCTGAGCCGTTGGACAG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Ubq1-1:1:1      CTACAGCTGTGCCACGTGCGGCCGCGCAAGCCGAAGCAAGCACGCTGAGCCGTTGGACAG
P-SETit.Ubq1-1:1:2      CTACAGCTGTGCCACGTGCGGCCGCGCAAGCCGAAGCAAGCACGCTGAGCCGTTGGACAG

P-SETit.Ubq1-1:1:4      CTTGTCATAATGCCATTACGTGGATTACACGTAACTGGCCCTGTAACTACTCGTTCGGCC
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Ubq1-1:1:1      CTTGTCATAATGCCATTACGTGGATTACACGTAACTGGCCCTGTAACTACTCGTTCGGCC
P-SETit.Ubq1-1:1:2      CTTGTCATAATGCCATTACGTGGATTACACGTAACTGGCCCTGTAACTACTCGTTCGGCC

P-SETit.Ubq1-1:1:4      ATCATCAAACGACGACGTCCGCTAGGCGACGACACGGGTAATGCACGCAGCCACCCAGGC
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------CACGGGTAATGCACGCAGCCACCCAGGC
P-SETit.Ubq1-1:1:1      ATCATCAAACGACGACGTCCGCTAGGCGACGACACGGGTAATGCACGCAGCCACCCAGGC
P-SETit.Ubq1-1:1:2      ATCATCAAACGACGACGTCCGCTAGGCGACGACACGGGTAATGCACGCAGCCACCCAGGC
                                                 ****************************

P-SETit.Ubq1-1:1:4      GCGCGCGCTAGCGGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTCGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      GCGCGCGCTAGCGGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTCGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG
P-SETit.Ubq1-1:1:1      GCGCGCGCTAGCGGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTCGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG
P-SETit.Ubq1-1:1:2      GCGCGCGCTAGCGGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTCGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:4      GGTTAACGCCAGAAACAGTGTTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAAATATTCACACGA
P-SETit.Ubq1-1:1:3      GGTTAACGCCAGAAACAGTGTTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAAATATTCACACGA
P-SETit.Ubq1-1:1:1      GGTTAACGCCAGAAACAGTGTTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAAATATTCACACGA
P-SETit.Ubq1-1:1:2      GGTTAACGCCAGAAACAGTGTTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAAATATTCACACGA
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:4      AAGAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAAACTCACGCCCGCTA
P-SETit.Ubq1-1:1:3      AAGAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAAACTCACGCCCGCTA
P-SETit.Ubq1-1:1:1      AAGAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAAACTCACGCCCGCTA
P-SETit.Ubq1-1:1:2      AAGAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAAACTCACGCCCGCTA
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:4      ACATCCAACGGCCAACAGCTCGACGTGCCGGTCAGCAGAGCATCGGAACACTGGTGATTG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ACATCCAACGGCCAACAGCTCGACGTGCCGGTCAGCAGAGCATCGGAACACTGGTGATTG
P-SETit.Ubq1-1:1:1      ACATCCAACGGCCAACAGCTCGACGTGCCGGTCAGCAGAGCATCGGAACACTGGTGATTG
P-SETit.Ubq1-1:1:2      ACATCCAACGGCCAACAGCTCGACGTGCCGGTCAGCAGAGCATCGGAACACTGGTGATTG
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:4      GTGGAGCCGGCAGTATGCGCCCCAGCACGGCCGAGGTGGTGGTGGCCCGTGGCCCTGCTG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      GTGGAGCCGGCAGTATGCGCCCCAGCACGGCCGAGGTGGTGGTGGCCCGTGGCCCTGCTG
P-SETit.Ubq1-1:1:1      GTGGAGCCGGCAGTATGCGCCCCAGCACGGCCGAGGTGGTGGTGGCCCGTGGCCCTGCTG
P-SETit.Ubq1-1:1:2      GTGGAGCCGGCAGTATGCGCCCCAGCACGGCCGAGGTGGTGGTGGCCCGTGGCCCTGCTG
                        ************************************************************
```

FIG. 6b

```
P-SETit.Ubq1-1:1:4      TCTGCGCGGCTCGGGACAACTTGAAACTGGGCCACCGCCTCGTCGCAACTCGCAACCCGT
P-SETit.Ubq1-1:1:3      TCTGCGCGGCTCGGGACAACTTGAAACTGGGCCACCGCCTCGTCGCAACTCGCAACCCGT
P-SETit.Ubq1-1:1:1      TCTGCGCGGCTCGGGACAACTTGAAACTGGGCCACCGCCTCGTCGCAACTCGCAACCCGT
P-SETit.Ubq1-1:1:2      TCTGCGCGGCTCGGGACAACTTGAAACTGGGCCACCGCCTCGTCGCAACTCGCAACCCGT
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:4      TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTCGTAGGGGCCCGGGTAGAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTCGTAGGGGCCCGGGTAGAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG
P-SETit.Ubq1-1:1:1      TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTCGTAGGGGCCCGGGTAGAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG
P-SETit.Ubq1-1:1:2      TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTCGTAGGGGCCCGGGTAGAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:4      CTTCGATTCACATAACATGGGCCTGAAGCTCTAAAACGACGGCCCGGTCGCCGCGCGATG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      CTTCGATTCACATAACATGGGCCTGAAGCTCTAAAACGACGGCCCGGTCGCCGCGCGATG
P-SETit.Ubq1-1:1:1      CTTCGATTCACATAACATGGGCCTGAAGCTCTAAAACGACGGCCCGGTCGCCGCGCGATG
P-SETit.Ubq1-1:1:2      CTTCGATTCACATAACATGGGCCTGAAGCTCTAAAACGACGGCCCGGTCGCCGCGCGATG
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:4      GAAAGAGACCGGATCCTCCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACCACCG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      GAAAGAGACCGGATCCTCCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACCACCG
P-SETit.Ubq1-1:1:1      GAAAGAGACCGGATCCTCCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACCACCG
P-SETit.Ubq1-1:1:2      GAAAGAGACCGGATCCTCCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACCACCG
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:4      ACGCGGAGGAGTCGTGCGTGGTCCAACACGGCCGGCGGGCTGGGCTGCGACCTTAACCAG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ACGCGGAGGAGTCGTGCGTGGTCCAACACGGCCGGCGGGCTGGGCTGCGACCTTAACCAG
P-SETit.Ubq1-1:1:1      ACGCGGAGGAGTCGTGCGTGGTCCAACACGGCCGGCGGGCTGGGCTGCGACCTTAACCAG
P-SETit.Ubq1-1:1:2      ACGCGGAGGAGTCGTGCGTGGTCCAACACGGCCGGCGGGCTGGGCTGCGACCTTAACCAG
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:4      CAAGGCACGCCACGACCCGCCCCGCCCTCGAGGCATAAATACCCTCCCATCC
P-SETit.Ubq1-1:1:3      CAAGGCACGCCACGACCCGCCCCGCCCTCGAGGCATAAATACCCTCCCATCC
P-SETit.Ubq1-1:1:1      CAAGGCACGCCACGACCCGCCCCGCCCTCGAGGCATAAATACCCTCCCATCC
P-SETit.Ubq1-1:1:2      CAAGGCACGCCACGACCCGCCCCGCCCTCGAGGCATAAATACCCTCCCATCC
                        ************************************************
```

FIG. 6c

```
E-Cl.Ubq1-1:1:1     AGCAGACTCGCATTATCGATGGAGCTCTACCAAACTGGCCCTAGGCATTAACCTACCATG
P-Cl.Ubq1-1:1:1     AGCAGACTCGCATTATCGATGGAGCTCTACCAAACTGGCCCTAGGCATTAACCTACCATG
P-Cl.Ubq1-1:1:3     ------------------------------------------------------------
P-Cl.Ubq1-1:1:4     ------------------------------------------------------------
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ------------------------------------------------------------

E-Cl.Ubq1-1:1:1     GATCACATCGTAAAAAAAAAACCCTACCATGGATCCTATCTGTTTTCTTTTTGCCCTGAA
P-Cl.Ubq1-1:1:1     GATCACATCGTAAAAAAAAAACCCTACCATGGATCCTATCTGTTTTCTTTTTGCCCTGAA
P-Cl.Ubq1-1:1:3     ------------------------------------------------------------
P-Cl.Ubq1-1:1:4     ----------------------------------CTATCTGTTTTCTTTTTGCCCTGAA
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ------------------------------------------------------------

E-Cl.Ubq1-1:1:1     AGAGTGAAGTCATCATCATATTTACCATGGCGCGCGTAGGAGCGCTTCGTCGAAGACCCA
P-Cl.Ubq1-1:1:1     AGAGTGAAGTCATCATCATATTTACCATGGCGCGCGTAGGAGCGCTTCGTCGAAGACCCA
P-Cl.Ubq1-1:1:3     ------------------------------------------------------------
P-Cl.Ubq1-1:1:4     AGAGTGAAGTCATCATCATATTTACCATGGCGCGCGTAGGAGCGCTTCGTCGAAGACCCA
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ------------------------------------------------------------

E-Cl.Ubq1-1:1:1     TAGGGGGGCGGTACTCGCACCGTGGTTGTTTCCTGTTATGTAATATCGGATGGGGGAGCA
P-Cl.Ubq1-1:1:1     TAGGGGGGCGGTACTCGCACCGTGGTTGTTTCCTGTTATGTAATATCGGATGGGGGAGCA
P-Cl.Ubq1-1:1:3     ------------------------------------------------------------
P-Cl.Ubq1-1:1:4     TAGGGGGGCGGTACTCGCACCGTGGTTGTTTCCTGTTATGTAATATCGGATGGGGGAGCA
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ------------------------------------------------------------

E-Cl.Ubq1-1:1:1     GTCGGCTAGGTTGGTCCCATCGGTACTGGTCGTCCCCTAGTGCGCTAGATGCGCGATGTT
P-Cl.Ubq1-1:1:1     GTCGGCTAGGTTGGTCCCATCGGTACTGGTCGTCCCCTAGTGCGCTAGATGCGCGATGTT
P-Cl.Ubq1-1:1:3     ------------------------------------------------------------
P-Cl.Ubq1-1:1:4     GTCGGCTAGGTTGGTCCCATCGGTACTGGTCGTCCCCTAGTGCGCTAGATGCGCGATGTT
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ------------------------------------------------------------

E-Cl.Ubq1-1:1:1     TGTCCTCAAAAACTCTTTTCTTCTTAATAACAATCATACGCAAATTTTTTGCGTATTCGA
P-Cl.Ubq1-1:1:1     TGTCCTCAAAAACTCTTTTCTTCTTAATAACAATCATACGCAAATTTTTTGCGTATTCGA
P-Cl.Ubq1-1:1:3     ------------------------------------------------------------
P-Cl.Ubq1-1:1:4     TGTCCTCAAAAACTCTTTTCTTCTTAATAACAATCATACGCAAATTTTTTGCGTATTCGA
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ------------------------------------------------------------

E-Cl.Ubq1-1:1:1     GAAAAAAAGAAGATTCTATCTGTTTTTTTTTTGAAATGGCTCCAATTTATAGGAGGAGCC
P-Cl.Ubq1-1:1:1     GAAAAAAAGAAGATTCTATCTGTTTTTTTTTTGAAATGGCTCCAATTTATAGGAGGAGCC
P-Cl.Ubq1-1:1:3     ------------------------------------------------------------
P-Cl.Ubq1-1:1:4     GAAAAAAAGAAGATTCTATCTGTTTTTTTTTTGAAATGGCTCCAATTTATAGGAGGAGCC
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ------------------------------------------------------------

E-Cl.Ubq1-1:1:1     CGTTTAACGGCGTCGACAAATCTAACGGACACCAACCAGCGAATGAGCGAACCCACCAGC
P-Cl.Ubq1-1:1:1     CGTTTAACGGCGTCGACAAATCTAACGGACACCAACCAGCGAATGAGCGAACCCACCAGC
P-Cl.Ubq1-1:1:3     ----------------CAAATCTAACGGACACCAACCAGCGAATGAGCGAACCCACCAGC
P-Cl.Ubq1-1:1:4     CGTTTAACGGCGTCGACAAATCTAACGGACACCAACCAGCGAATGAGCGAACCCACCAGC
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ------------------------------------------------------------
```

FIG. 7a

```
E-Cl.Ubq1-1:1:1     GCCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGACGGCCGAGACGCTGACACCCTTGCCTTGGCGCGGCA
P-Cl.Ubq1-1:1:1     GCCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGACGGCCGAGACGCTGACACCCTTGCCTTGGCGCGGCA
P-Cl.Ubq1-1:1:3     GCCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGACGGCCGAGACGCTGACACCCTTGCCTTGGCGCGGCA
P-Cl.Ubq1-1:1:4     GCCAAGCTAGCCAAGCGAAGCAGACGGCCGAGACGCTGACACCCTTGCCTTGGCGCGGCA
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ------------------------------------------------------------

E-Cl.Ubq1-1:1:1     TCTCCGTCGCTGGCTCGCTGGCTCTGGCCCCTTCGCGAGAGTTCCGGTCCACCTCCACCT
P-Cl.Ubq1-1:1:1     TCTCCGTCGCTGGCTCGCTGGCTCTGGCCCCTTCGCGAGAGTTCCGGTCCACCTCCACCT
P-Cl.Ubq1-1:1:3     TCTCCGTCGCTGGCTCGCTGGCTCTGGCCCCTTCGCGAGAGTTCCGGTCCACCTCCACCT
P-Cl.Ubq1-1:1:4     TCTCCGTCGCTGGCTCGCTGGCTCTGGCCCCTTCGCGAGAGTTCCGGTCCACCTCCACCT
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ------------------------------------------------------------

E-Cl.Ubq1-1:1:1     GTGTCGGTTTCCAACTCCGTTCCGCCTTCGCGTGGGACTTGTTCCGTTCATCCGTTGGCG
P-Cl.Ubq1-1:1:1     GTGTCGGTTTCCAACTCCGTTCCGCCTTCGCGTGGGACTTGTTCCGTTCATCCGTTGGCG
P-Cl.Ubq1-1:1:3     GTGTCGGTTTCCAACTCCGTTCCGCCTTCGCGTGGGACTTGTTCCGTTCATCCGTTGGCG
P-Cl.Ubq1-1:1:4     GTGTCGGTTTCCAACTCCGTTCCGCCTTCGCGTGGGACTTGTTCCGTTCATCCGTTGGCG
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ------------------------------------------------------------

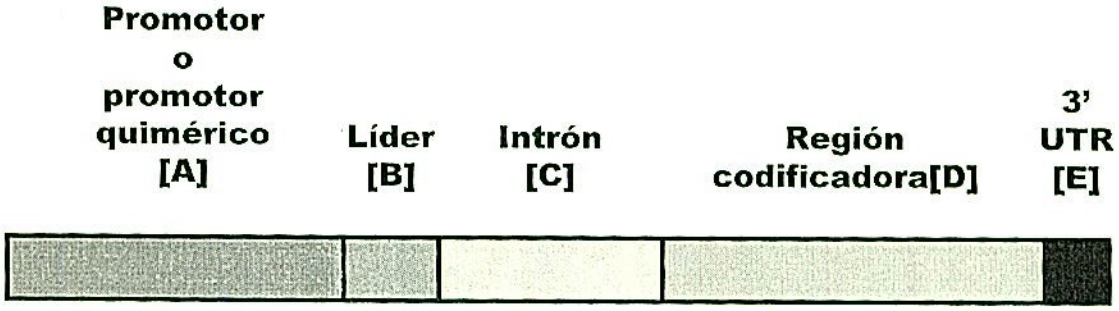
E-Cl.Ubq1-1:1:1     GCATCCGGAAATTGCGTGGCGTAGAGCACGGGGCCCTCCTCTCACACGGCACGGAACCGT
P-Cl.Ubq1-1:1:1     GCATCCGGAAATTGCGTGGCGTAGAGCACGGGGCCCTCCTCTCACACGGCACGGAACCGT
P-Cl.Ubq1-1:1:3     GCATCCGGAAATTGCGTGGCGTAGAGCACGGGGCCCTCCTCTCACACGGCACGGAACCGT
P-Cl.Ubq1-1:1:4     GCATCCGGAAATTGCGTGGCGTAGAGCACGGGGCCCTCCTCTCACACGGCACGGAACCGT
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ------------------------------------------------------------

E-Cl.Ubq1-1:1:1     CACGAGCTCACGGCACCGGCAGCACGGCGGGGATTCCTTCCCCACCACCGCTCCTTCCCT
P-Cl.Ubq1-1:1:1     CACGAGCTCACGGCACCGGCAGCACGGCGGGGATTCCTTCCCCACCACCGCTCCTTCCCT
P-Cl.Ubq1-1:1:3     CACGAGCTCACGGCACCGGCAGCACGGCGGGGATTCCTTCCCCACCACCGCTCCTTCCCT
P-Cl.Ubq1-1:1:4     CACGAGCTCACGGCACCGGCAGCACGGCGGGGATTCCTTCCCCACCACCGCTCCTTCCCT
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ------------------------------------------------------------

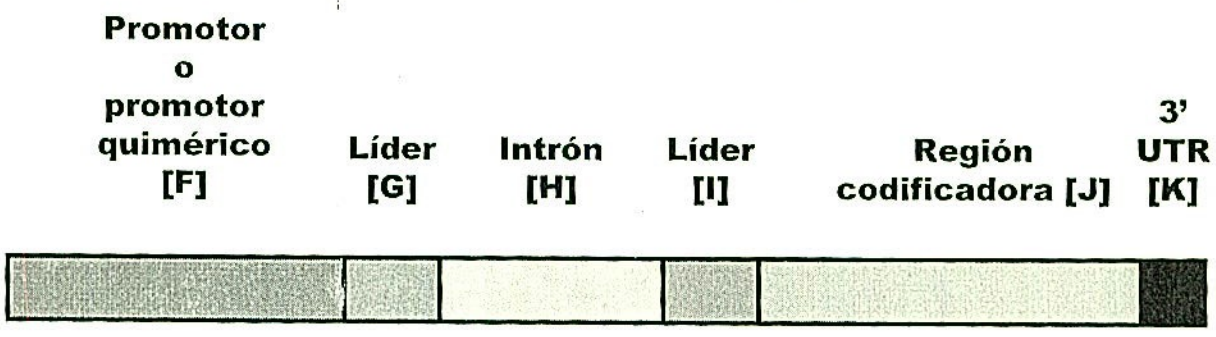
E-Cl.Ubq1-1:1:1     TTCCCTTCCTCGCCCGCC----------------------------------------
P-Cl.Ubq1-1:1:1     TTCCCTTCCTCGCCCGCCATCATAAATAGCCACCCCTCCCAGCTTCCTTCGCCACAT
P-Cl.Ubq1-1:1:3     TTCCCTTCCTCGCCCGCCATCATAAATAGCCACCCCTCCCAGCTTCCTTCGCCACAT
P-Cl.Ubq1-1:1:4     TTCCCTTCCTCGCCCGCCATCATAAATAGCCACCCCTCCCAGCTTCCTTCGCCACAT
P-Cl.Ubq1-1:1:5     ---CCTTCCTCGCCCGCCATCATAAATAGCCACCCCTCCCAGCTTCCTTCGCCACAT
                       ***************
```

FIG. 7b

Configuración del casete transgénico 1



Configuración del casete transgénico 2



Configuración del casete transgénico 3

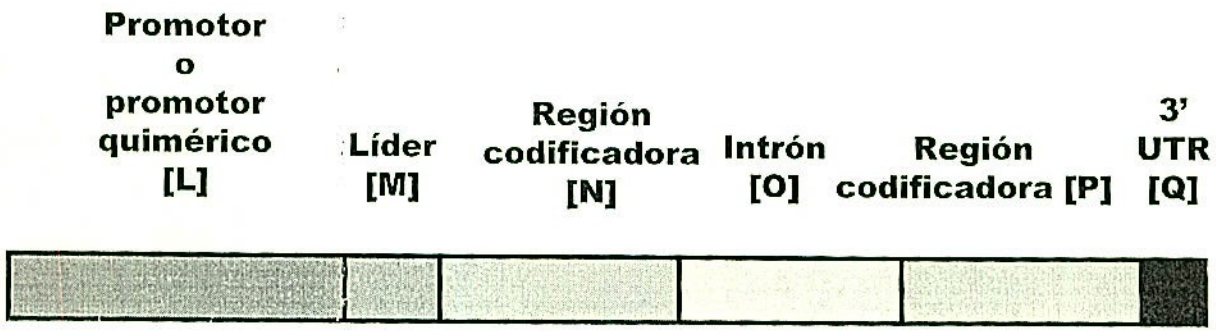


FIG. 8