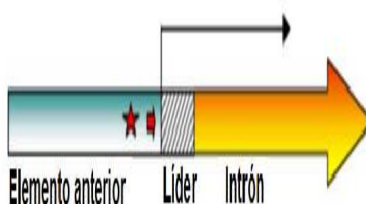


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

FIG.1



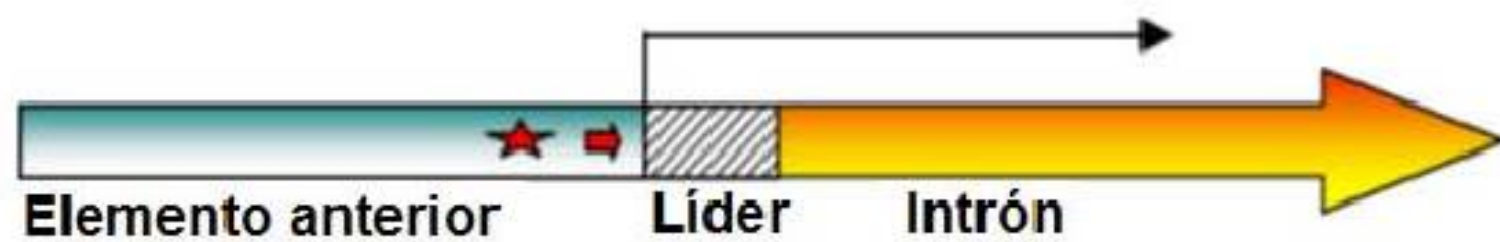
1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
PROMOTORES DE UBIQUITINA DE MAÍZ NOVEDOSOS			
2	Datos del Solicitante		
Nombre:		DOW AGROSCIENCES LLC	Dirección Electrónica:
			clientes@cavelier.com
Dirección:		9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América	Domicilio/País de constitución:
			ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - INDIANA - INDIANAPOLIS
Identificación:			
☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT	
Número:		54141-	
3	Solicitantes		

Apellidos - Nombres o Razón Social		Tipo	Identificación
1.	DOW AGROSCIENCES LLC	EE	54141
4	Datos del Inventor		
Nombre:		Sandeep KUMAR	Dirección Electrónica: clientes@cavelier.com
Dirección:		201 Wyndotte Drive Carmel, Indiana 46032, Estados Unidos de América	Domicilio/País de constitución: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - INDIANA - CARMEL
Identificación:			
☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT ☒ No Aplica			
Número:		-	
5	Inventor(es)		
Apellidos - Nombres		Domicilio	
1.	KUMAR Sandeep	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	
2.	GUPTA Manju	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	
3.	WRIGHT Terry R.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	
4.	JAYNE Susan M.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	
5.	SMITH Doug A.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	
6.	ALABED Diaa	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	
6	Datos Inventor(es)		
País de Residencia		Departamento/Estado	Ciudad Dirección

1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	CARMEL	201 Wyndotte Drive Carmel, Indiana 46032, Estados Unidos de América
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	NOBLESVILLE	13463 Winamac Court Noblesville, Indiana 46032, Estados Unidos de América
3.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	CARMEL	14162 Charity Chase Circle Carmel, Indiana 46074, Estados Unidos de América
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	ZIONSVILLE	1962 Camargue Drive Zionsville, Indiana 46077, Estados Unidos de América
5.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	NOBLESVILLE	19038 Edwards Grove Drive Noblesville, Indiana 46060, Estados Unidos de América
6.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	INDIANA	CARMEL	13310 Golden Gate Drive East Carmel, Indiana 46074, Estados Unidos de América
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		JOSE ANDRES RINCON USCATEGUI	Dirección Electrónica:	clientes@cavelier.com
Dirección:		CARRERA. 4 No. 72-35	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - CUNDINAMARCA - BOGOTA D.C.
Identificación:				
☒ CEDULA DE CIUDADANIA			☐ CEDULA DE EXTRANJERIA	
☐ EMPRESA EXTRANJERA			☐ NIT	
☐ PASAPORTE				
Número:		79780910-		
Presentación de Poder				

Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/US2014/072917	Fecha Solicitud:	31/12/2014
Número Publicacion:		WO 2015/103351 A1	Fecha Publicacion:	09/07/2015
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	Codigo del país US	(31) No. Solicitud 61/922,525	(32) Fecha 31/12/2013
10	Reivindicaciones			
Número reivindicaciones:		50	Pago Reivindicaciones:	No
11	Reducción de tasas.			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
12	Documentos Anexos			
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☒ Listado de secuencias ☒ Artes finales 12 x 12 cm ☒ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos				

FIG. 1



PROMOTORES DE UBIQUITINA DE MAÍZ NOVEDOSOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta aplicación reivindica el beneficio conforme al artículo
119 (e), título 35 del USC [Código de Estados Unidos] de la
solicitud de patente provisional estadounidense n.º
61/922,525, presentada el 31 de diciembre de 2013, cuya
descripción se incorpora a la presente en su totalidad
10 mediante esta referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere en general al campo de la biología
15 molecular vegetal y más específicamente, al campo de la
expresión de transgenes en plantas.

ANTECEDENTES

20 Muchas especies de plantas son capaces de transformarse con
transgenes para introducir rasgos o características
agronómicamente deseables. Las especies vegetales se
desarrollan y/o modifican para que tengan rasgos deseables
en particular. Generalmente, los rasgos deseables incluyen,
25 por ejemplo, mejorar la calidad de valor nutricional,

aumentar el rendimiento, conferir resistencia a plagas o enfermedades, aumentar la tolerancia a sequía y estrés, mejorar las calidades hortícolas (por ejemplo, pigmentación y crecimiento), impartir resistencia a herbicidas, permitir
5 la producción de compuestos y/o materiales de la planta útiles en la industria y/o permitir la producción de productos farmacéuticos.

Las especies de plantas transgénicas que comprenden
10 múltiples transgenes apilados en un solo locus genómico se producen mediante tecnologías de transformación vegetal. Las tecnologías de transformación vegetal dan como resultado la introducción de un transgén en una célula vegetal, la recuperación de una planta transgénica fértil que contiene
15 la copia integrada de manera estable del transgén en el genoma de la planta, y la posterior expresión del transgén mediante transcripción y traducción del genoma vegetal dan como resultado plantas transgénicas que poseen rasgos y fenotipos deseables. Sin embargo, se prefieren los
20 mecanismos que permiten la producción de especies de plantas transgénicas para expresar en gran medida múltiples transgenes modificados genéticamente como una pila de rasgos.

25 Asimismo, se prefieren los mecanismos que permiten la

expresión de un transgén dentro de órganos o tejidos vegetales particulares. Por ejemplo, la resistencia aumentada de una planta a la infección por los patógenos transmitidos por la tierra se puede lograr mediante la transformación del genoma vegetal con una proteína de resistencia a los patógenos que se expresa de gran manera dentro de las raíces de la planta. De manera alternativa, puede ser conveniente expresar un transgén en tejidos vegetales que están en una fase determinada de desarrollo o crecimiento particular, tal como, por ejemplo, la elongación o división celular.

En la presente se describen elementos reguladores del promotor de Ubi-1 de *Zea mays*, incluyendo promotores, promotores anteriores, 5'-UTR, e intrones. Se describen adicionalmente construcciones y métodos que utilizan los elementos génicos reguladores.

COMPENDIO

20

En la presente se describen promotores, construcciones y métodos para expresar un transgén en células vegetales y/o tejidos vegetales. En una modalidad, la expresión de un transgén comprende el uso de un promotor. En una modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de

polinucleótidos. En una modalidad, una secuencia de polinucleótidos promotora comprende un promotor anterior, una región 5' no traducida (5'-UTR) o secuencia líder, y un intrón. En una modalidad, secuencia de polinucleótidos promotora comprende el gen de Ubiquitina-1 (Ubi-1). En una modalidad, secuencia de polinucleótidos promotora comprende el gen de Ubi-1 de *Zea mays* (*Z. mays*).

En una modalidad, una construcción incluye un gen de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos promotora que se obtuvo del gen de Ubi-1 de *Z. mays*. En una modalidad, la secuencia de polinucleótidos promotora de Ubi-1 de *Z. mays* comprende una región promotora anterior, 5'-UTR o secuencias líder y un intrón. En una modalidad, una construcción incluye un casete de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos promotora obtenida del gen de Ubi-1 de *Z. mays* fusionada a un intrón del gen que codifica la proteína fluorescente amarilla de especies de *Phialidium* (*PhiYFP*, por sus siglas en inglés). En una modalidad, una construcción incluye un casete de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos promotora obtenida del gen de Ubi-1 de *Z. mays* fusionada a un intrón del gen que codifica la proteína fluorescente amarilla de especies de *Phialidium* (*PhiYFP*) seguida por una región 3' no traducida (3'-UTR) del gen de

la Peroxidasa 5 de *Z. mays*. (*ZmPer5*). La secuencia de polinucleótidos resultante comprende un elemento regulador del gen promotor novedoso.

- 5 En una modalidad, un casete de expresión génica incluye un elemento regulador del gen promotor unido operativamente a un transgén o a una secuencia codificante heteróloga. En una modalidad, un casete de expresión génica incluye al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve,
10 diez o más transgenes.

En la presente, se describen los métodos para cultivar plantas que expresen un transgén utilizando el elemento regulador del gen promotor novedoso (por ejemplo, un
15 promotor anterior, 5'-UTR e intrón). En la presente se describen los métodos para hacer cultivos de células y tejidos vegetales utilizando el elemento regulador del gen promotor novedoso. En una modalidad, los métodos descritos en la presente incluyen la expresión génica constitutiva en
20 el polen, callo, raíces y hojas vegetales. También se describen en la presente, los métodos para purificar una secuencia de polinucleótidos que comprende el elemento regulador del gen promotor novedoso.

La Figura 1 muestra un promotor novedoso esquemático que comprende el gen de Ubi-1 de *Zea mays* c.v. B73. El promotor está compuesto de un elemento anterior, una secuencia líder o 5'-UTR y un intrón. El elemento anterior está ubicado en la posición 5' anterior del Lugar de Inicio de la Transcripción (TSS, por sus siglas en inglés), indicado por la flecha larga. El elemento anterior está compuesto de elementos reguladores, tales como una caja TATA, indicada por la flecha corta, y un elemento de choque indicado por la estrella.

La Figura 2 muestra el mapa plásmido para el vector pDAB105714 que comprende la secuencia promotora amplificada de PCR del gen de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37.

La Figura 3 muestra la secuencia de polinucleótidos del promotor de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (SEQ ID NO: 1) con la región promotora anterior subrayada, la secuencia líder/5'-UTR con sombra y la región intrón en minúsculas.

La Figura 4 muestra la secuencia de polinucleótidos del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 (SEQ ID NO: 2) con la región promotora anterior subrayada, la secuencia líder/5'-UTR con sombra y la región intrón en minúsculas.

La Figura 5 muestra la alineación de la secuencia de polinucleótidos de las regiones promotoras anteriores de *Z. mays* c.v. LLN37 (SEQ ID NO: 4) comparada con la secuencia
5 promotora anterior de control *Z. mays* c.v. B73 (SEQ ID NO: 3).

La Figura 6 muestra la alineación de la secuencia de polinucleótidos de las regiones líder de *Z. mays* c.v. LLN37
10 (SEQ ID NO: 6) comparada con la secuencia líder/5'-UTR de control de *Z. mays* c.v. B73 (SEQ ID NO: 5).

La Figura 7 muestra la alineación de la secuencia de polinucleótidos de las regiones intrón de *Z. mays* c.v. LLN37
15 (SEQ ID NO: 8) comparada con la secuencia intrón de control *Z. mays* c.v. B73 (SEQ ID NO: 7).

La Figura 8 muestra un mapa de vectores de la construcción de expresión binaria pDAB105748, que comprende el vector de
20 entrada de control, pDAB105742 (*Z. mays* c.v. B73), insertada en el vector de destino pDAB10197.

La Figura 9 muestra un mapa de vectores de la construcción de expresión binaria pDAB105747, que comprende el vector de
25 entrada, pDAB105741 (*Z. mays* c.v. LLN37), insertada en el

vector de destino pDAB10197.

La Figura 10 muestra la expresión génica *PhiYFP* en el callo vegetal T₀ para las construcciones de expresión binaria pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73) y pDAB105747 (*Z. mays* c.v. LLN37).

La Figura 11 muestra la expresión génica *PhiYFP* en el polen vegetal T₁ para las construcciones de expresión binaria pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73), pDAB105747 (*Z. mays* c.v. LLN37), y un control negativo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

Tal como se usa en la presente, los artículos “un”, “una” y “el/la” incluye referencias en plural a menos que el contexto claramente y sin ambigüedades lo indique de otra manera.

Tal como se usa en la presente, el término “retrocruzamiento” se refiere a un proceso en el que un cultivador cruza una progenie híbrida nuevamente con uno de sus progenitores, por ejemplo, un híbrido F1 de primera

generación con uno de los genotipos parentales del híbrido F1.

Tal como se usa en la presente, el término "intrón" se
5 refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico comprendida
en un gen (o secuencia de nucleótidos expresada de interés)
que está transcrita pero no traducida. Los intrones incluyen
la secuencia de ácido nucleico no traducida dentro de una
secuencia de ADN expresada, así como también la secuencia
10 correspondiente en las moléculas de ARN transcritas a partir
de esta.

Una construcción descrita en la presente también puede
contener secuencias que mejoran la traducción y/o la
15 estabilidad de ARNm tales como intrones. Un ejemplo de
dicho intrón es el primer intrón del gen II de la variante
de histona H3 de *Arabidopsis thaliana* o cualquier otra
secuencia de intrones comúnmente conocida. Los intrones se
pueden usar en combinación con una secuencia promotora para
20 mejorar la traducción y/o la estabilidad del ARNm.

Tal como se usa en la presente, los términos "región 5' no
traducida" o "5'-UTR" se refieren al segmento no traducido
en el extremo 5' de pre-ARNm o ARNm maduros. Por ejemplo, en
25 los ARNm maduros, una 5'-UTR típicamente posee en su extremo

5' un casquete de 7-metilguanosina y participa en muchos procesos tales como empalme, poliadenilación, exportación del ARNm hacia el citoplasma, identificación del extremo 5' del ARNm mediante la maquinaria de traducción y protección de los ARNm contra la degradación.

Tal como se usa en la presente, los términos "región 3' no traducida" o "3'-UTR" se refieren al segmento no traducido en el extremo 3' de pre-ARNm o ARNm maduros. Por ejemplo, en los ARNm maduros esta región posee la cola poli-(A) y se sabe que cumple varios roles en la estabilidad del ARNm, la iniciación de la traducción, y la exportación del ARNm.

Tal como se usa en la presente, el término "señal de poliadenilación" se refiere a una secuencia de ácido nucleico presente en transcripciones de ARNm que permite que las transcripciones, cuando están en presencia de una poli-(A) polimerasa, se poliadenilen en el sitio de poliadenilación, por ejemplo, ubicado 10 a 30 bases posteriores a la señal poli-(A). En la técnica se conocen muchas señales de poliadenilación y son útiles para la presente invención. Una secuencia de ejemplo incluye AAUAAA y variantes de esta, tal como se describe en Loke J., et ál., (2005) Plant Physiology 138(3); 1457-1468.

Tal como se usa en la presente, el término "aislado" se refiere a un componente biológico (inclusive una proteína o ácido nucleico) que ha sido separado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en la que el
5 componente se origina naturalmente (es decir, otro ADN extracromosomal y cromosomal).

Tal como se usa en la presente, el término "purificado" en referencia a las moléculas de ácido nucleico no requieren
10 ser absolutamente puros (tales como una preparación homogénea). Por el contrario, "purificado" representa una indicación de que la secuencia es relativamente más pura que si entorno celular natural. Por ejemplo, el nivel "purificado" de los ácidos nucleicos debe ser al menos 2-5
15 veces mayor en términos de concentración o niveles de expresión génica en comparación con su nivel natural.

Las moléculas de ADN reivindicadas se pueden obtener directamente del ADN total o del ARN total. Además, los
20 clones de ADNc que no sean de origen natural, pero que sean preferentemente obtenidos de la manipulación de una sustancia de origen natural parcialmente purificada (ARN mensajero). La construcción de una biblioteca de ADNc a partir de ARNm implica la creación de una sustancia
25 sintética (ADNc). Los clones de ADNc individuales se pueden

purificar a partir de la biblioteca sintética mediante la selección de clones de las células que portan la biblioteca de ADNc. Por lo tanto, el proceso que incluye la construcción de una biblioteca de ADNc a partir del ARNm y la purificación de clones de ADNc distintos proporciona una purificación de aproximadamente 10^6 veces del mensaje natural. Asimismo, una secuencia de ADN promotora se puede clonar en un plásmido. Dicho clon que no es de origen natural, pero que sean preferentemente obtenidos de la manipulación de una sustancia de origen natural parcialmente purificada, tal como una biblioteca de ADN genómica. Por lo tanto, en estas técnicas es preferible la purificación de al menos un orden de magnitud, preferentemente dos o tres órdenes, y más preferentemente cuatro o cinco órdenes de magnitud.

De manera similar, la purificación representa una indicación de que se ha producido un cambio funcional o químico en la secuencia de ADN del componente. Las proteínas y moléculas de ácido nucleico que fueron "purificadas" incluyen las proteínas y las moléculas de ácido nucleico purificadas mediante métodos de purificación estándares. El término "purificado" también comprende ácidos nucleicos y proteínas preparadas mediante métodos de ADN recombinante en una célula hospedadora (por ejemplo,

células vegetales), así como también péptidos, proteínas y moléculas de ácido nucleico químicamente sintetizadas.

El término "recombinante" significa una célula u organismo
5 en el que se ha producido la recombinación genética. También incluye una molécula (por ejemplo, un vector, plásmido, ácido nucleico, polipéptido o ARN pequeño) que ha sido alterado artificialmente o sintéticamente (es decir, no naturalmente) por la intervención humana. La alteración
10 se puede realizar dentro de la molécula, o se puede quitar de su entorno o estado natural.

Tal como se usa en la presente, el término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual se transcribe un
15 polinucleótido en ARNm (incluyendo moléculas de ARN pequeñas) y/o el proceso mediante el cual el ARNm transcrito (también llamado "transcripto") se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. La expresión génica puede verse influenciada por señales
20 externas, por ejemplo, exposición de una célula, tejido, u organismo a un agente que aumenta o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen también se puede regular en cualquier parte de la vía de ADN a ARN a proteína. La regulación de la expresión génica ocurre, por ejemplo, a
25 través de controles que actúan en la transcripción,

traducción, transporte y procesamiento del ARN, degradación de moléculas intermediarias tal como ARNm, o a través de activación, inactivación, compartimentación o degradación de moléculas de proteínas específicas luego de su
5 elaboración, o mediante combinaciones de estas. La expresión génica se puede medir a nivel del ARN a nivel de proteína mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, de modo no taxativo, transferencia Northern, RT-PCR, transferencia Western, o ensayos de actividad
10 proteica *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*.

Tal como se usa en la presente, los términos "silenciamiento génico basado en homología" o "HBGS" son términos genéricos que incluyen tanto el silenciamiento génico transcripcional
15 y el silenciamiento génico postranscripcional. El silenciamiento de un locus objetivo mediante un locus de silenciamiento no unido puede ser el resultado de la inhibición de la transcripción (por ejemplo, silenciamiento génico transcripcional; TGS, por sus siglas en inglés) o la
20 degradación del ARNm (por ejemplo, silenciamiento génico postranscripcional; PTGS, por sus siglas en inglés), debido a la producción de ARN de doble cadena (ARNcd) que corresponde a secuencias promotoras o transcritas, respectivamente. La participación de diferentes componentes
25 celulares en cada proceso sugiere que el TGS y PTGS inducido

por el ARNcd probablemente sea el resultado de la diversificación de un mecanismo antiguo común. Sin embargo, ha sido difícil lograr una comparación estricta de TGS y PTGS debido a que generalmente depende del análisis de
5 diferentes locus de silenciamiento. Se puede indicar que un solo locus de transgén inicia ambos, TGS y PTGS, debido a la producción de ARNcd que corresponde a secuencias promotoras y transcritas de diferentes genes objetivo.

10 Tal como se usa en la presente, los términos "molécula de ácido nucleico", "ácido nucleico" o "polinucleótido" (los tres términos son sinónimos entre sí) hacen referencia a una forma polimérica de nucleótidos, que pueden incluir ambas cadenas, sentido y antisentido de ARN, ADNc, ADN genómico y
15 formas sintéticas, y polímeros mezclados de estos. Un "nucleótido" puede referirse a un ribonucleótido, deoxirribonucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una molécula de ácido nucleico frecuentemente tiene al menos diez bases de longitud, a
20 menos que se especifique lo contrario. Los términos pueden hacer referencia a una molécula de ARN o ADN de longitud indeterminada. Los términos incluyen formas monocatenarias y bicatenarias del ADN. Una molécula de ácido nucleico puede incluir cualquiera o ambos nucleótidos de origen natural y
25 modificados unidos por enlaces de nucleótidos de origen

natural y/o de origen no natural.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden modificar químicamente o bioquímicamente, o pueden contener bases de
5 nucleótidos no naturales o derivatizados, como lo entenderá fácilmente un experto en la técnica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, sustitución de uno o más nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótidas (por ejemplo, enlaces no
10 cargados, tales como metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.; enlaces cargados, tales como fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.; restos colgantes, tales como péptidos; intercaladores, tales como acridina, psoraleno, etc.; quelantes; alquilantes; y enlaces
15 modificados, tales como ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). El término "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier conformación topológica, incluyendo conformaciones monocatenarias, bicatenarias, parcialmente en dúplex, en tríplex, en forma de horquilla, circulares y en
20 candado.

La transcripción procede desde 5' a 3' a lo largo de la cadena de ADN. Esto significa que el ARN se realiza mediante la adición secuencial de ribonucleótido-5'-trifosfatos al
25 extremo 3' de la cadena creciente con una eliminación

necesaria del pirofosfato. Ya sea en una molécula de ácido nucleico lineal o circular, los distintos elementos (por ejemplo, secuencias de nucleótido en particular) se pueden definir como que están "anteriores" con respecto a un
5 elemento adicional si están o estarán unidos al mismo ácido nucleico en la dirección 5' de ese elemento. De manera similar, los distintos elementos pueden estar "posteriores" con respecto a un elemento adicional si están o estarán unidos al mismo ácido nucleico en la dirección 3' de ese
10 elemento.

Tal como se usa en la presente, el término "posición base" se refiere a la ubicación de una base o residuo de nucleótido dado dentro de un ácido nucleico designado. Un
15 ácido nucleico designado se puede definir mediante el alineamiento con un ácido nucleico de referencia.

Tal como se usa en la presente, el término "hibridación" se refiere a un proceso donde los oligonucleótidos y sus
20 análogos se hibridan mediante enlaces de hidrógeno, que incluyen los enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido, entre bases complementarias. Generalmente, las moléculas de ácido nucleico consisten en bases nitrogenadas que son ya sea pirimidinas (citosina (C),
25 uracilo (U), y timina (T)) o purinas tales como adenina (A)

y guanina (G)). Las bases nitrogenadas forman enlaces de hidrógeno entre una pirimidina y una purina, y la unión de una pirimidina a una purina se denomina "apareamiento de bases". Más específicamente, A formará un enlace de hidrógeno a T o U, y G se unirá específicamente a C. "Complementario" se refiere al apareamiento de bases que ocurre entre dos secuencias de ácido nucleico distintas o dos regiones distintas de la misma secuencia de ácido nucleico.

10

Tal como se usa en la presente, los términos "específicamente hibridable" y "específicamente complementario" se refiere a un grado suficiente de complementariedad de modo que ocurre la unión estable y específica entre un oligonucleótido y un DNA o ARN objetivo. Los oligonucleótidos no tienen que ser necesariamente 100 % complementarios a la secuencia objetivo para hibridarse específicamente. Un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la molécula de ADN o ARN objetivo interfiere con la función normal del ADN o ARN objetivo, y hay suficiente grado de complementariedad para evitar la unión no específica de un oligonucleótido a secuencias no objetivo en condiciones donde se desea la unión específica, por ejemplo, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos o sistemas *in*

25

vivo. Dicha unión se denomina hibridación específica. Las condiciones de hibridación que dan como resultado grados de rigurosidad en particular variarán en función de la naturaleza del método de hibridación elegido y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico de que se hibridan. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{2+}) de un amortiguador de hibridación contribuirá a la rigurosidad de hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen en la rigurosidad. Los cálculos con respecto a las condiciones de hibridación necesarias para lograr grados de rigurosidad en particular se discuten en Sambrook et ál. (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da. ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.

Tal como se usa en la presente, el término "condiciones de rigurosidad" comprende las condiciones en las que la hibridación solo ocurrirá si hay menos de 50 % de mal apareamiento entre la molécula de hibridación y el ADN objetivo. "Condiciones de rigurosidad" incluyen niveles adicionales de rigurosidad en particular. Por lo tanto, tal como se usa en la presente, las condiciones de "rigurosidad moderada" son aquellas en las que las moléculas con más de

50 % de mal apareamiento de secuencia no se hibridarán; las condiciones de "rigurosidad alta" son aquellas en las que las secuencias con más de 20 % de mal apareamiento no se hibridarán; y las condiciones de "rigurosidad muy alta" son aquellas en las que las secuencias con más de 10 % de mal apareamiento no se hibridarán.

En modalidades particulares, las condiciones de rigurosidad pueden incluir la hibridación a 65 °C, seguida por lavados a 65 °C con 0,1x SSC/SDS al 0,1 % durante 40 minutos. Las siguientes son condiciones de hibridación representativas y no taxativas:

- Rigurosidad Muy Alta: Hibridación en amortiguador SSC 5x a 65 °C durante 16 horas; lavar dos veces en amortiguador SSC 2x a temperatura ambiente durante 15 minutos cada uno; y lavar dos veces en amortiguador SSC 0,5x SSC a 65 °C durante 20 minutos cada uno.
- Rigurosidad Alta: hibridación en amortiguador SSC 5-6 x a 65-70 °C durante 16-20 horas; lavar dos veces en amortiguador SSC 2 x a temperatura ambiente durante 5-20 minutos cada uno; y lavar dos veces en amortiguador SSC 1x SSC a 55-70 °C durante 30 minutos cada uno.

- Rigurosidad Moderada: hibridación en amortiguador SSC 6x a temperatura ambiente hasta 55 °C durante 16-20 horas; lavar al menos dos veces en amortiguador SSC 2x-3x a temperatura ambiente hasta 55 °C durante 20-30 minutos cada uno.

En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridables pueden permanecer unidas en condiciones de hibridación de rigurosidad muy alta. En una
10 modalidad, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridables pueden permanecer unidas en condiciones de hibridación de rigurosidad alta. En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridables pueden permanecer unidas en condiciones de hibridación de
15 rigurosidad moderada.

Tal como se usa en la presente, el término "oligonucleótido" se refiere a un polímero de ácido nucleico corto. Los oligonucleótidos se pueden formar mediante la escisión de
20 segmentos de ácido nucleico más largos o mediante la polimerización de los precursores de nucleótidos individuales. Los sintetizadores automáticos permiten la síntesis de oligonucleótidos de hasta varios cientos de pares de bases de longitud. Dado que los oligonucleótidos se
25 pueden unir a una secuencia de nucleótidos complementaria,

se pueden usar como sondas para detectar ADN o ARN. Los oligonucleótidos compuestos por ADN (oligodesoxirribonucleótidos) se pueden usar en reacción en cadena de la polimerasa, una técnica para la amplificación de secuencias de ADN pequeñas. En la reacción en cadena de la polimerasa, a un oligonucleótido típicamente se lo denomina "cebador" lo que permite que la ADN polimerasa extienda el oligonucleótido y replique la cadena complementaria.

10

Tal como se usa en la presente, los términos "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" se refieren a un procedimiento o técnica en la que se amplifican cantidades ínfimas de ácido nucleico, ARN y/o ADN, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4,683,195. Generalmente, la información de la secuencia de los extremos de la región de interés o más allá debe estar disponible, de manera que se puedan diseñar los cebadores de oligonucleótidos. Los cebadores de PCR serán idénticos o similares en la secuencia a las cadenas opuestas de la planilla de ácido nucleico a ser amplificados. Los nucleótidos de extremo 5' de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR se puede usar para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN de ADN genómico total, y

25

ADNc transcrito de ARN celular total, secuencias de bacteriófagos o plásmidos, etc. Ver en general, Mullis et ál., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263 (1987); Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989).

5

Tal como se usa en la presente, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis junto con una cadena complementaria, cuando las condiciones son adecuadas para la síntesis de un producto de extensión de cebador. Las condiciones de síntesis incluyen la presencia de cuatro deoxirribonucleótidos trifosfato diferentes (es decir, A, T, G y C) y al menos una enzima o un agente de inducción de la polimerización tal como una transcriptasa inversa o ADN polimerasa. Estos reactivos típicamente están presentes en un amortiguador adecuado, que puede incluir constituyentes que son cofactores o que afectan condiciones tales como el pH y similares a varias temperaturas adecuadas. Un cebador es preferentemente una secuencia de cadena simple, de modo que se optimiza la eficacia de amplificación, pero se pueden utilizar secuencias de cadena doble.

Tal como se usa en la presente, el término "sonda" se refiere a una secuencia de polinucleótidos u oligonucleótidos que se hibridan a una secuencia objetivo.

25

En el procedimiento de ensayo TaqMan® o de estilo TaqMan®, la sonda hibrida a una parte del objetivo situado entre el sitio de hibridación de los dos cebadores. Una sonda incluye alrededor de ocho nucleótidos, alrededor de diez
5 nucleótidos, alrededor de quince nucleótidos, alrededor de veinte nucleótidos, alrededor de treinta nucleótidos, alrededor de cuarenta nucleótidos o alrededor de cincuenta nucleótidos. En algunas modalidades, una sonda incluye de alrededor de ocho nucleótidos a alrededor de quince
10 nucleótidos.

En el procedimiento del ensayo de transferencia Southern, la sonda hibrida a un fragmento de ADN que está unido a una membrana. Una sonda incluye alrededor de diez nucleótidos,
15 alrededor de 100 nucleótidos, alrededor de 250 nucleótidos, alrededor de 500 nucleótidos, alrededor de 1000 nucleótidos, alrededor de 2500 nucleótidos o alrededor de 5000 nucleótidos. En algunas modalidades, una sonda incluye de alrededor de 500 nucleótidos a alrededor de 2500
20 nucleótidos.

Una sonda puede también incluir una etiqueta detectable, tal como, etiqueta radioactiva, etiqueta biotinilada (por ejemplo, Texas-Red®, isotiocianato de fluoresceína, etc.).
25 La etiqueta detectable puede estar unida de manera

covalente directamente al oligonucleótido de sonda, de manera que la etiqueta esté ubicada en el extremo 5' o en el extremo 3' de la sonda. Una sonda que comprende un fluoróforo también puede incluir adicionalmente un inactivador (por ejemplo, Black Hole Quencher™, Iowa Black™, etc.).

Tal como se usa en la presente, los términos "identidad de secuencia" o "identidad" se pueden usar de forma intercambiable y se refieren a residuos de ácido nucleico en dos secuencias que son iguales cuando se alinean para la máxima correspondencia en una ventana de comparación especificada.

Tal como se usa en la presente, el término "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje de homología de secuencia" se refiere a un valor determinado al comparar dos secuencias alineadas de forma óptima (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos) en una ventana de comparación, donde la parte de una secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones, sustituciones, errores de apareamiento, y/o eliminaciones (es decir, huecos) en comparación con una secuencia de referencia para obtener el alineamiento óptimo de las dos secuencias. Un porcentaje se calcula al determinar el número

de posiciones en las que un residuo idéntico de ácido nucleico o de aminoácido se presenta en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones emparejadas, dividir el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicar el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Se conocen los métodos para alinear secuencias para su comparación. Varios programas de computación o bioinformática y algoritmos de alineación, tales como ClustalW y Sequencher, también se conocen en la técnica y/o se describen en por ejemplo: Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444; Higgins y Sharp (1988) *Gene* 73:237-44; Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-3; Corpet et ál. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang et ál. (1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65; Pearson et ál. (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-31; Tatiana et ál. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50.

20

El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST™; Altschul et ál. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10) se encuentra disponible de varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Bethesda, MD),

25

y en internet, para usar en relación con varios programas de análisis de secuencias. En la sección de "ayuda" de BLAST™ en internet se proporciona una descripción sobre cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa.

- 5 Para comparaciones de secuencias de ácido nucleico, se puede usar la función "secuencias Blast 2" del programa BLAST™ (Blastn) utilizando los parámetros por defecto. Las secuencias de ácido nucleico con similitud aun mayor con respecto a las secuencias de referencia mostrarán
- 10 porcentajes de identidad en aumento cuando se analizan con este método.

Tal como se usa en la presente, el término "unido de manera operativa" se refiere a un ácido nucleico colocado en una

15 relación funcional con otro ácido nucleico. Generalmente, "unido de manera operativa" puede significar que los ácidos nucleicos enlazados están contiguos. La unión se puede lograr mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los enlazadores o adaptadores de

20 oligonucleótidos sintéticos se ligan o hibridan al ácido nucleico y se usan para unir el fragmento de polinucleótido contiguo. Sin embargo, los elementos no necesitan ser contiguos para estar unidos de manera operativa.

25 Tal como se usa en la presente, el término "promotor" se

refiere a una región de ADN que está generalmente ubicada en la parte anterior de un gen (es decir, hacia el extremo 5' de un gen) y es necesario para iniciar y conducir la transcripción del gen. Un promotor puede permitir la
5 activación adecuada o la represión de un gen que controla. Un promotor puede contener secuencias específicas que son reconocidas por los factores de transcripción. Estos factores se pueden unir a una secuencia de ADN promotora, que resulta en la captación de polimerasa ARN, una enzima
10 que sintetiza el ARN de la región codificante del gen. El promotor generalmente se refiere a todos los elementos reguladores del gen ubicados en la parte anterior del gen, incluyendo 5'-UTR, intrones y secuencias líder.

15 Tal como se usa en la presente, el término "promotor anterior" se refiere a una secuencia de polinucleótidos contigua que es suficiente para dirigir el inicio de la transcripción. Tal como se usa en la presente, un promotor anterior comprende el sitio de inicio de la transcripción
20 con varios motivos de secuencias, que incluye una caja TATA, una secuencia iniciadora (Intr), elementos de reconocimiento de TFIIB (BRE) y otros motivos de promotores (Jennifer, E.F. et ál., (2002) *Genes & Dev.*, 16: 2583-2592). El promotor anterior proporciona el sitio de acción a la ARN polimerasa
25 II, una enzima con múltiples subunidades con los factores de

transcripción general o basal tipo TFIIA, B, D, E, F y H. Estos factores se ensamblan en un complejo de preinicio de la transcripción (PIC, por sus siglas en inglés) que cataliza la síntesis de ARN de una plantilla de ADN.

5

La activación del promotor anterior se realiza mediante la adición de elementos de secuencias de ADN reguladoras a las cuales se unen varias proteínas y subsecuentemente interactúan con el complejo de inicio de la transcripción para activar la expresión génica. Estas secuencias de elementos reguladores interactúan con factores de unión a ADN específicos. Estos motivos de secuencias a veces se pueden llamar elementos *cis*. Tales elementos *cis*, a los que se unen los factores de transcripción específicos del desarrollo o específicos del tejido, individualmente o en combinación, pueden determinar el patrón de expresión espaciotemporal de un promotor en el nivel transcripcional. Estos elementos *cis* varían ampliamente en el tipo de control que ejercen en los genes unidos de manera operativa. Algunos elementos actúan para aumentar la transcripción de genes unidos de manera operativa en respuesta a respuestas ambientales (por ejemplo, temperatura, humedad y lesión). Otros elementos *cis* pueden responder a las señales del desarrollo (por ejemplo, germinación, maduración de la semilla y florecimiento) o a

10
15
20
25

la información espacial (por ejemplo, la especificidad del tejido). Ver, por ejemplo, Langridge et ál. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3219-23. Estos elementos *cis* están ubicados a una distancia variante del punto de inicio de la transcripción. Algunos elementos *cis* (llamados elementos próximos) están adyacentes a una región promotora nuclear mínima, mientras que otros elementos se pueden ubicar a varios kilobases 5' anteriores o 3' posteriores del promotor (potenciadores).

10

Tal como se usa en la presente, el término "transformación" abarca todas las técnicas por las cuales se puede introducir una molécula de ácido nucleico en una célula. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo: transfección con vectores víricos; transformación con vectores de plásmidos; electroporación; lipofección; microinyección (Mueller et ál. (1978) Cell 15:579-85); transferencia mediada por *Agrobacterium*; ABSORCIÓN DIRECTA DEL ADN; TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR WHISKERS™; Y BOMBARDEO DE MICROPROYECTILES. Estas técnicas se pueden usar para la transformación estable y para la transformación transitoria de una célula vegetal. "Transformación estable" se refiere a la introducción de un fragmento de ácido nucleico en un genoma de un organismo hospedador lo que resulta en una herencia estable genéticamente. Una vez que está transformado de manera

25

estable, el fragmento de ácido nucleico se integra establemente en el genoma del organismo hospedador y cualquier generación posterior. Los organismos hospedadores que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se llaman organismos "transgénicos". "Transformación transitoria" se refiere a la introducción de un fragmento de ácido nucleico en el núcleo u organelo que contiene ADN de un organismo hospedador, lo que resulta en la expresión génica sin herencia estable genéticamente.

10

Tal como se usa en la presente, el término "transducir" se refiere a un proceso donde un virus transfiere ácido nucleico a una célula.

15 Tal como se usa en la presente, el término "transgén" se refiere a una secuencia de ácido nucleico exógena. En un ejemplo, un transgén es una secuencia de genes (por ejemplo, un gen con resistencia a herbicidas), un gen que codifica un compuesto útil farmacéutica e industrialmente, o un gen que
20 codifica un rasgo agrícola deseable. En aun otro ejemplo, un transgén es una secuencia de ácido nucleico antisentido, donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico antisentido inhibe expresión de una secuencia de ácido nucleico objetivo. Un transgén puede contener secuencias
25 reguladoras unidas de manera operativa al transgén (por

ejemplo, un promotor, intrón, 5'-UTR o 3'-UTR). En algunas modalidades, un ácido nucleico de interés es un transgén. Sin embargo, en otras modalidades, un ácido nucleico es un ácido nucleico endógeno, donde se desean copias genómicas
5 adicionales del ácido nucleico endógeno, o un ácido nucleico que se encuentra en la orientación antisentido con respecto a la secuencia de un ácido nucleico objetivo en un organismo hospedador.

10 Tal como se usa en la presente, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico de la manera que se introduce en una célula, produciendo de esa manera una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que permiten que se replique en la célula
15 hospedadora, tal como un origen de replicación. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, un plásmido, cósmido, bacteriófago, cromosoma artificial bacteriano (BAC, por sus siglas en inglés), o virus que transporta ADN exógeno hacia una célula. Un vector también puede incluir uno o más genes,
20 moléculas antisentido, genes de marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, provocando de esta forma que la célula exprese las moléculas y/o proteínas de ácido nucleico codificadas por el vector.
25 Un vector puede opcionalmente incluir materiales para ayudar

a lograr la entrada de la molécula de ácido nucleico en la célula (por ejemplo, un lipoma).

Tal como se usa en la presente, los términos "casete",
5 "casete de expresión" y "casete de expresión génica" se refieren a un segmento de ADN que se puede insertar en un ácido nucleico o polinucleótido en sitios de restricción específicos o mediante recombinación homóloga. Un segmento de ADN comprende un polinucleótido que contiene un gen de
10 interés que codifica un ARN pequeño o un polipéptido de interés y el casete y los sitios de restricción se designan para asegurar la inserción del casete en el marco de lectura adecuado para la transcripción y traducción. En una modalidad, un casete de expresión puede incluir un
15 polinucleótido que codifica un ARN pequeño o un polipéptido de interés y tiene elementos además del polinucleótido que facilitan la transformación de una célula hospedadora particular. En una modalidad, un casete de expresión génica también puede incluir elementos que permiten la expresión
20 mejorada de un ARN pequeño o un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés en una célula hospedadora. Estos elementos pueden incluir, de modo no taxativo: un promotor, un promotor mínimo, un potenciador, un elemento de respuesta, un intrón, un 5'-UTR, un 3'-UTR, una secuencia
25 de terminación, una secuencia de poliadenilación y

similares.

Tal como se usa en la presente, el término "secuencia codificante heteróloga" se usa para indicar cualquier polinucleótido que codifique o que finalmente codifique un péptido o proteína o su secuencia de aminoácidos equivalente, por ejemplo, una enzima que no está presente en el organismo hospedador y que se puede expresar en la célula hospedadora a condiciones adecuadas. De tal manera, las "secuencias codificantes heterólogas" pueden incluir una o más copias de secuencias codificantes que no están normalmente presentes en la célula hospedadora, de manera que la célula expresa copias adicionales de una secuencia codificante que no está presente normalmente en las células. La secuencia codificante heteróloga puede ser ARN o cualquier tipo de esta (por ejemplo, ARNm), ADN o cualquier tipo de este (por ejemplo, ADNc), o un híbrido de ARN/ADN. Los ejemplos de secuencias codificantes incluyen, de modo no taxativo, unidades de transcripción de longitud completa que comprenden dichas características como la secuencia codificante, intrones, regiones promotoras, 5'-UTR, 3'-UTR y regiones potenciadoras.

Las "secuencias codificantes heterólogas" también incluyen la parte codificante del péptido o enzima (es decir, la

secuencia de ARNm o ADNc), la parte codificante de la unidad de transcripción de longitud completa (es decir, el gen que comprende intrones y exones), secuencias con "codones optimizados", secuencias truncadas u otras formas de secuencias alteradas que codifican la enzima o codifican su secuencia de aminoácido equivalente, siempre que la secuencia de aminoácidos equivalente produzca una proteína funcional. Dicha secuencia de aminoácidos equivalente puede tener una eliminación de uno o más aminoácidos, la eliminación es de extremo N, extremo C o interna. Las formas truncadas se visualizan siempre que tengan la capacidad catalítica indicada en ella.

Como se usa en la presente, el término "control" se refiere a una muestra usada en el procedimiento analítico con fines comparativos. Un control puede ser "positivo" o "negativo". Por ejemplo, si el propósito del procedimiento analítico es detectar un polipéptido o una transcripción expresada de forma diferencial en células o tejidos, generalmente es preferible que se incluya un control positivo, tal como una muestra de una planta conocida que presenta una expresión deseada, y un control negativo, tal como una muestra que no presenta la expresión deseada.

Tal como se usa en la presente, el término "planta" incluye

plantas o partes de plantas, incluyendo, de modo no taxativo células vegetales y tejidos vegetales, tales como hojas, callos, vástagos, raíces, flores, polen y semillas. Una clase de planta que se puede usar en la presente

5 invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas inferiores y superiores susceptibles a mutagénesis incluyendo angiospermas, gimnospermas, helechos y algas multicelulares. Por lo tanto, "planta" incluye plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Los ejemplos de plantas

10 dicotiledóneas incluyen, tabaco, *Arabidopsis*, soja, tomate, papaya, canola, girasol, algodón, alfalfa, papa, vid, guandul, guisante, *Brassica*, garbanzo, remolacha azucarera, colza, sandía, melón, pimienta, maní, calabaza, rábano, espinaca, calabacín, brócoli, repollo, zanahoria, coliflor,

15 apio, repollo chino, pepino, palta y lechuga. Los ejemplos de plantas monocotiledóneas incluyen maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, cebada, centeno, sorgo, orquídeas, bambú, banana, totora, lirios, avena, cebolla, mijo y triticale.

20 Tal como se usa en la presente, el término "material vegetal" se refiere a hojas, callos, vástagos, raíces, flores o partes de flores, frutas, polen, óvulos, cigotos, semillas, recortes, cultivos de tejidos o de células o cualquier otra parte o producto de una planta. En una

25 modalidad, el material vegetal incluye cotiledóneo y hojas.

En una modalidad, el material vegetal incluye tejidos de raíces y otros tejidos vegetales ubicados bajo la tierra.

Tal como se usa en la presente, el término "gen marcador seleccionable" se refiere a un gen que se usa opcionalmente en la transformación vegetal para, por ejemplo, proteger células vegetales de un agente selectivo o proporcionar resistencia/tolerancia a un agente selectivo. Además, "gen marcador seleccionable" pretende comprender genes indicadores. Solo aquellas células o plantas que reciben un marcador seleccionable funcional son capaces de dividirse o crecer en condiciones con un agente selectivo. Los ejemplos de agentes selectivos pueden incluir, por ejemplo, antibióticos, incluyendo espectinomomicina, neomicina, kanamicina, paromomicina, gentamicina e higromicina. Estos marcadores seleccionables incluyen neomicina fosfotransferasa (npt II), que expresa una enzima que confiere resistencia al antibiótico kanamicina y genes para los antibióticos relacionados, neomicina, paromomicina, gentamicina y G418, o el gen para higromicina fosfotransferasa (hpt), que expresa una enzima que confiere resistencia a higromicina. Otros genes marcadores seleccionables pueden incluir genes que codifican la resistencia a herbicidas incluyendo bar o pat (resistencia contra glufosinato de amonio o fosfinotricina),

acetolactato sintasa (ALS, resistencia contra inhibidores tales como sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TP), oxibenzoatos de pirimidinilo (POB, por sus siglas en inglés), y sulfonilamino carbonil triazolinonas que evitan el primer paso en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada), glifosato, 2,4-D, y resistencia o sensibilidad metálica. Los ejemplos de “genes indicadores” que pueden usarse como un gen marcador seleccionable incluyen la observación visual de proteínas de gen indicador expresadas tales como proteínas que codifican la β -glucuronidasa (GUS), luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), proteína amarilla fluorescente (YFP, por sus siglas en inglés), DsRed, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), fosfatasa alcalina y similares. La frase “positivo para marcador” se refiere a plantas que se han transformado para que incluyan un gen marcador seleccionable.

Tal como se usa en la presente, el término “marcador detectable” se refiere a una etiqueta capaz de detectarse, tales como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminescente, un compuesto quimioluminescente, quelante metálico o enzima. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, de modo no taxativo,

los siguientes: etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina),
5 quimioluminescente, grupos biotinilo, epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítomos). En una
10 modalidad, un marcador detectable puede estar unido mediante grupos espaciadores de varias longitudes para reducir impedimentos estéricos potenciales.

Tal como se usa en la presente, el término “detectar” se
15 usa en el sentido más amplio para incluir ambas medidas, cualitativa y cuantitativa, de una molécula específica, por ejemplo, medidas de un polipéptido específico.

A menos que se explique específicamente lo contrario, todos
20 los términos científicos y técnicos utilizados en la presente tienen el mismo significado comprendido comúnmente por los expertos en la técnica a los que concierne esta divulgación. Las definiciones de los términos comunes en la biología molecular se pueden encontrar, por ejemplo en:
25 Lewin, Genes V, Oxford University Press, 1994; Kendrew et

ál. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994; y Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995.

5

Los promotores como elementos reguladores de la expresión génica

Los promotores vegetales usados para la investigación básica
10 o las aplicaciones biotecnológicas son generalmente unidireccionales, que dirigen la expresión constitutiva de solo un gen que ha sido fusionado a su extremo 3' (posterior). Generalmente es necesario expresar transgenes dentro de las plantas para la modificación genética y la
15 apilamiento de rasgos. Además, múltiples promotores novedosos son típicamente necesarios en los cultivos transgénicos para conducir la expresión de genes múltiples. En la presente se describe un promotor constitutivo que puede dirigir la expresión de un transgén que ha sido
20 fusionado en su extremo 3'.

El desarrollo de los productos transgénicos se está volviendo muy complejo, lo que requiere que se expresen transgenes y que se apilen múltiples transgenes en un solo
25 locus. Tradicionalmente, cada transgén necesita un promotor

único para la expresión donde se necesitan múltiples promotores para expresar transgenes diferentes dentro de una pila de genes. Con un tamaño en aumento de rasgos génicos, este método frecuentemente conlleva al uso repetido del mismo promotor para obtener niveles similares de patrones de expresión de diferentes transgenes para la expresión de un único rasgo poligénico.

Se sabe que las construcciones génicas múltiples conducidas por el mismo promotor causan el silenciamiento de genes lo que resulta en productos transgénicos menos eficaces en el campo. El exceso de sitios de unión a factores de transcripción (TF, por sus siglas en inglés) debido a la repetición de promotores puede causar la disminución de TF endógeno, lo que lleva a la inactivación transcripcional. El silenciamiento de los transgenes probablemente afectará de forma no deseada el rendimiento de una planta transgénica producida para expresar transgenes. Las secuencias repetitivas dentro de un transgén pueden llevar a la recombinación homóloga dentro del locus del gen lo que resulta en reestructuraciones de polinucleótidos.

Además de los promotores constitutivos, los promotores específicos de órganos o específicos de tejidos conducen la expresión génica en determinados tejidos tales como en el

grano, raíz, hoja, callo, polen o tapetum de la planta. Los promotores específicos de la etapa de desarrollo y de tejidos conducen la expresión de genes, que se expresan en tejidos particulares o en períodos de tiempo particulares

5 durante el desarrollo de la planta. Los promotores específicos de los tejidos son necesarios para determinadas aplicaciones en la industria de plantas transgénicas y son deseables ya que permiten la expresión específica de genes heterólogos en un tejido y/o en etapas de desarrollo

10 seleccionadas, que indican la expresión del gen heterólogo de manera diferencial en varios órganos, tejidos, y/o en diferentes momentos, pero no otros.

Por ejemplo, la resistencia aumentada de una planta a la

15 infección por los patógenos transmitidos por la tierra se puede lograr mediante la transformación del genoma vegetal con una proteína de resistencia a los patógenos que se expresa de gran manera dentro de la planta. De manera alternativa, puede ser conveniente expresar un transgén en

20 tejidos vegetales que están en una fase determinada de desarrollo o crecimiento particular, tal como, por ejemplo, la elongación o división celular. Otra aplicación es la conveniencia de usar promotores específicos de tejidos, de manera que los promotores limiten la expresión de los

25 transgenes que codifican un rasgo agronómico en las partes

de las plantas en desarrollo (es decir, raíces, hojas, callos o polen).

Los promotores descritos en la presente son herramientas
5 prometedoras para hacer construcciones de transgenes
comerciales que contengan múltiples genes. Estos promotores
también proporcionan la estabilidad estructural en
hospedadores bacterianos y la estabilidad funcional en las
células vegetales, tal como reducir el silenciamiento del
10 transgén para permitir la expresión del transgén. Los
promotores con intervalos de expresión variantes también se
pueden obtener mediante el uso de métodos descritos en la
presente. En comparación con las construcciones de
transgenes utilizando un único promotor varias veces, las
15 construcciones de promotores diversificados descritos en la
presente solicitud son más compatibles para el análisis
molecular posterior de eventos transgénicos. El uso de los
promotores diversificados descritos en la presente también
alivian las reestructuraciones en los locus con múltiples
20 genes transgénicos durante el direccionamiento con la
tecnología de dedos de cinc (SHUKLA et ál. 2009).

Promotores de Ubiquitina-1 de *Zea mays*

25 El promotor de Ubi-1 de *Zea mays* ha sido un estándar en la

industria de la biotecnología, predominantemente se usa para la expresión transgénica alta y estable en el maíz (CHRISTENSEN y QUAIL 1996; CHRISTENSEN et ál. 1992; TOKI et ál. 1992). Cada transgén usualmente necesita un promotor
5 específico para una expresión suficiente. Típicamente, se necesitan múltiples promotores para expresar transgenes diferentes dentro de una pila de genes. Este paradigma frecuentemente conlleva al uso repetitivo del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* debido a sus altos niveles deseados de
10 expresión de proteínas y patrón de expresión constitutivo.

Sin embargo, la introducción deliberada de secuencias repetitivas en un locus transgénico también puede llevar a efectos negativos indeseables en la expresión de transgenes
15 y estabilidad (FLADUNG y KUMAR 2002; KUMAR y FLADUNG 2000a; KUMAR y FLADUNG 2000b; KUMAR y FLADUNG 2001a; KUMAR y FLADUNG 2001b; KUMAR y FLADUNG 2002; METTE et ál. 1999; MOURRAIN et ál. 2007). El desafío de la expresión de transgenes coordinados múltiple se puede abordar usando un enfoque de diversidad
20 de promotores, donde los diferentes promotores se utilizan para conducir diferentes transgenes con el mismo perfil de expresión (PEREMARTI et ál. 2010). Esta solicitud describe una secuencia promotora de Ubi-1 diversificada obtenida mediante la identificación y purificación de promotores
25 novedosos de diferentes genotipos de *Zea mays*.

La modulación e inicio de la transcripción de la expresión génica en genes vegetales son dirigidas por una variedad de elementos de secuencias de ADN dispuestos de manera colectiva en una secuencia mayor denominada promotor. Los promotores eucariotas típicamente consisten en un promotor nuclear mínimo y secuencias reguladoras anteriores. El promotor nuclear es un tramo mínimo de secuencia de ADN contigua suficiente para dirigir un inicio preciso de la transcripción. Los promotores nucleares en plantas generalmente comprenden regiones canónicas asociadas con el inicio de la transcripción, tales como cajas TATA y CAAT (secuencia de consenso TATAWAW). El elemento de la caja TATA normalmente está ubicado aproximadamente 20 a 35 pares de bases (pb) hacia la parte anterior del lugar de inicio de la transcripción (TSS). La activación del promotor nuclear se logra mediante secuencias reguladoras anteriores a las cuales se unen varias proteínas y subsecuentemente interactúan con el complejo de inicio de la transcripción para activar la expresión génica. Estos elementos reguladores comprenden secuencias de ADN que determinan el patrón de la expresión espacio-temporal de un promotor.

Haciendo referencia a la Figura 1, el promotor del gen Ubi-1 de *Z. mays* deriva de la línea celular endogámica B73 de

Z.mays. El promotor Ubi-1 de *Z. mays* está conformado por aproximadamente 895 pb de secuencia de ADN ubicada 5' anterior al TSS (es decir, el elemento anterior). Además, el promotor Ubi-1 de *Z. mays* está conformado por
5 aproximadamente 1093 pb de secuencia de ADN ubicada 3' posterior al TSS (ver patente estadounidense 5,510,474). Por lo tanto, el promotor Ubi-1 de *Z. mays* está conformado por aproximadamente 2 pares de kilobases (kb) de secuencia de ADN en total.

10

El elemento anterior del promotor Ubi-1 de *Z. mays* comprende una caja TATA ubicada aproximadamente 30 pb en la región 5' anterior del TSS (Figuras 1 y 3). Adicionalmente, el elemento anterior comprende dos elementos de consenso de
15 choque térmico superpuestos ubicados inmediatamente 5' anteriores del TSS. Una 5'-UTR de 82 pb o secuencia líder está ubicada inmediatamente 3' posterior del TSS y está seguida por un intrón que se extiende de la base 83 a la 1093 (Figuras 1 y 3).

20

Trabajos anteriores han descrito un aumento de la expresión génica de genes y/o transgenes regulados por el promotor Ubi-1 de *Z. mays*. Por ejemplo, la fusión de transcripción del gen cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) al promotor
25 Ubi-1 de *Z. mays* proporcionó un aumento de 10 veces del

nivel de actividad de CAT en protoplastos de maíz que la expresión conducida por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Christensen and Quail 1996; Christensen et ál. 1992).

5

Además del promotor Ubi-1 de *Z. mays* de control, esta solicitud describe un promotor novedoso Ubi-1 de *Z. mays*. Al contrario del promotor Ubi-1 de *Z. mays* de control derivado del genotipo de *Z. mays* c.v. B73, el promotor

10 novedoso Ubi-1 de *Z. mays* se derivó del genotipo de *Z. mays* c.v. LLN37. Se proporcionan construcciones y métodos que utilizan un promotor Ubi-1 de *Z. mayz* que comprende una secuencia de polinucleótidos. En una modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos del gen

15 Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como la que figura a continuación:

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGTT
ATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTTGTCACTTGTTTGAAGTGCAGTTTATCTATCT

20 TTATACATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATA
TCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAG
TATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTT
TTTTGCAAATAGCTTCACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAG
GGTTTAGGGTTAATGGTTTTTATAGACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATT

25 TTAGCCTCTAAATTAAGAAACTAAACTCTATTTTAGTTTTTTATTTAATAGTTTAG

ATATAAAATAGAATAAAATAAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTA
AAAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAACGCC
GTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGA
AGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCA
5 CCGTTGGA CT TGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGA
GCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCC
TTTCCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTC
CACACCCTCTTTCCCCAACCTCGTGTTGTTGCGAGCGCACACACACAACCAGATCTC
CCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGGTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCC
10 CCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGTTCGGGTCCATGCATGGTTAGGGCCCGGTA
GTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAG
CGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGACACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTG
TTTCTCTTTGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTTTCAT
GATTTTTTTTTGTTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTTGCCCTTTTCCTTTATTTCAATATAT
15 GCCGTGCACTTGTTTGTGCGGTCATCTTTTCATGCTTTTTTTTTGTCTTGGTTGTGATGA
TGTGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTTCAAACCTACCTGG
TGGATTTATTAATTTTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATATTCATAGTTACGAATTG
AAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACT
GATGCATATACAGAGATGCTTTTTGTTCGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTTGGGC
20 GGTCGTTTCATTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGTATTTA
TTAATTTTGGAACTGTATGTGTGTGTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGGA
TGGAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTACTGATGCATATAC
ATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAA
TAAACAAGTATGTTTTATAATTATTTGATCTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCA
25 GCAGCTATATGTGGATTTTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTACT

GTTTCTTTTGTGCGATGCTCACCTGTTGTTTGGTGTTACTTCTGCA (SEQ ID NO:
1)

En otra modalidad, un promotor puede comprender una
5 secuencia de polinucleótidos del gen Ubi-1 de *Z. mays* c.v.
LLN37 como la que figura a continuación:

GACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGTTATAAAAAAT
TACCACATATTTTTTTTGTCACTTGTGTTGAAGTGCAGTTTATCTATCTTTATACATA
10 TATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTGTTT
TAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGAC
AACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTGCAAA
TAGCTTCACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGG
TTAATGGTTTTTATAGACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCT
15 AAATTAAGAAAATAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAAT
AGAATAAAATAAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAACTA
AGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTAAACGCCGTCGACGAG
TCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGG
CACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGAC
20 TTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACG
GCAGGCGGCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCTTTCCCACC
GCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTCCACACCCCTC
TTTCCCCAACCTCGTGTTGTTTCGGAGCGCACACACACAACCAAGATCTCCCCAAATC
CACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGGTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCTCTCTAC
25 CTTCTCTAGATCGGCGTTCCGGTCCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCAT

GTTTGTGTTAGATCCGTGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGC
 GACCTGTACGTCAGACACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGGGGAATC
 CTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTTTCATGATTTTTTTTGTTCGT
 TGCATAGGGTTTGGTTTGGCCTTTTCCTTTATTTCAATATATGCCGTGCACTTGTTTGT
 5 CGGGTCATCTTTTCATGCTTTTTTTTGTCTTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCG
 GTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAATTTTG
 GATCTGTATGTGTGTGCCATACATATTCATAGTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAA
 TATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGAT
 GCTTTTTGTTTCGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTTCATTTCGTTCT
 10 AGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGTATTTATTAATTTTGGAACGTGA
 TGTGTGTGTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGGATGGAAATATCGATCTAG
 GATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGC
 ATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTTTA
 TAATTATTTTGATCTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATT
 15 TTTTGTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTGCGATGC
 TCACCCTGTTGTTTGGTGTACTTCTGCAG (SEQ ID NO: 2)

Los promotores descritos en la presente se caracterizaron
 por clonación y posterior análisis de homología de la
 20 secuencia de ADN para identificar regiones específicas del
 promotor (es decir, las regiones anteriores al promotor,
 5'-UTR e intrón). Se proporcionan construcciones y métodos
 que utilizan un promotor constitutivo Ubi-1 de *Z. mays* que
 comprende secuencias de polinucleótidos de una región
 25 promotora anterior, 5-UTR o región líder y un intrón para

la expresión de transgenes en plantas. En una modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos promotora anterior del gen Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como la que figura a continuación:

5

```

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGTT
ATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTGTGCACTTGTTTGAAGTGCAGTTTATCTATCT
TTATACATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATA
TCAGTGTTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAG
10 TATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTGTGTCATGTGTTCTCCTTTTT
TTTTGCAAATAGCTTCACCTATATAAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTAG
GGTTTAGGGTTAATGGTTTTTATAGACTAATTTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATT
TTAGCCTCTAAATTAAGAAACTAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAGTTTAG
ATATAAAATAGAATAAAATAAAGTGACTAAAAATTAACAAATACCCTTTAAGAAATTA
15 AAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTAAACGCC
GTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGA
AGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCA
CCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGA
GCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCC
20 TTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTC
CACACCCTCTT (SEQ ID NO: 3)

```

En otra modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos anterior al promotor del gen Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 como la que figura a

25

continuación:

GACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGTTATAAAAAAT
 TACCACATATTTTTTTTGTCACTTGTGTTGAAGTGCAGTTTATCTATCTTTATACATA
 5 TATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTGTTT
 TAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGAC
 AACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTGCAA
 TAGCTTCACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGG
 TTAATGGTTTTTATAGACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCT
 10 AAATTAAGAAAATAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAAT
 AGAATAAAATAAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAACTA
 AGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTAAACGCCGTCGACGAG
 TCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGG
 CACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGAC
 15 TTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACG
 GCAGGCGGCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCTTTCCCACC
 GCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCCTCCACACCCTC
 TT (SEQ ID NO: 4)

20 Elementos reguladores génicos adicionales

La expresión del transgén también se puede regular mediante
 una región 5'-UTR y/o intrón ubicada posterior a la
 secuencia promotora anterior. Un promotor que comprende una
 25 región promotora anterior unida de manera operativa a una

5'-UTR y/o intrón puede regular la expresión del transgén. Si bien es necesario un promotor anterior para conducir la transcripción, la presencia de una 5'-UTR y/o intrón puede aumentar los niveles de expresión que resultan en la producción de más transcritos de ARNm para la traducción y síntesis de proteínas. La adición de una 5'-UTR y/o intrón a una secuencia de polinucleótidos promotora anterior puede colaborar con la expresión estable de un transgén.

Adicionalmente, un promotor constitutivo que comprende secuencia de polinucleótidos promotora anterior puede estar seguido por una región líder o 5-UTR para colaborar en la expresión de transgenes en plantas. En una modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos líder o 5'-UTR del gen Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como la siguiente:

TCCCCAACCTCGTGTGTTGTTTCGGAGCGCACACACACAACCAGATCTCCCCCAAATCCA
CCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO: 5)

20

En otra modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos líder o 5'-UTR del gen Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 como la siguiente:

25 TCCCCAACCTCGTGTGTTGTTTCGGAGCGCACACACACAACCAGATCTCCCCCAAATCCA

CCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO: 6)

Adicionalmente, un promotor constitutivo que comprende una
 secuencia de polinucleótidos promotora anterior seguida por
 5 una región líder o 5-UTR puede también ser seguida por un
 intrón para colaborar en la expresión de los transgenes en
 plantas. En una modalidad, un promotor puede comprender una
 secuencia de polinucleótidos intrónica del gen Ubi-1 de *Z.
 mays* c.v. B73 como la siguiente:

10

GTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGTTCCG
 GTCCATGCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGT
 GTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGACA
 CGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCC
 15 GTTCCGCAGACGGGATCGATTTTCATGATTTTTTTTTGTTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTT
 GCCCTTTTCCTTTATTTCAATATATGCCGTGCACTTGTTTGTGCGGGTCATCTTTTCATG
 CTTTTTTTTGTCTTGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAG
 TAGAATTCTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAATTTTGGATCTGTATGTGTGTGC
 CATACATATTCATAGTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGG
 20 TATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTGTTGCTTGG
 TTGTGATGATGTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTTCATTGTTCTAGATCGGAGTAGAATAC
 TGTTTCAAACCTACCTGGTGTATTTATTAATTTTGGAACTGTATGTGTGTGTCATACATC
 TTCATAGTTACGAGTTTAAGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTG
 ATGTGGGTTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCT
 25 AACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTTATAATTATTTGATCTTG

ATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTAGCCCTGCCTTC
 ATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTGCGATGCTCACCTGTTGTTTGGT
 GTTACTTCTGCA (SEQ ID NO: 7)

- 5 En otra modalidad, un promotor puede comprender una
 secuencia intrónica de polinucleótidos del gen Ubi-1 de *Z.
 mays* c.v. LLN37 como la siguiente:

GTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGTTCCGGTCC
 10 ATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGTTTGTGT
 TAGATCCGTGCTGCTAGCGTTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGACACGTTCTGA
 TTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCA
 GACGGGATCGATTTTCATGATTTTTTTTTGTTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTTGCCCTTTT
 CCTTTATTTCAATATATGCCGTGCACTTGTTTGTGCGGGTCATCTTTTCATGCTTTTTTTT
 15 TGTCTTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATTC
 TGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAATTTTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATA
 TTCATAGTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATG
 TTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTTGTTCGCTTGGTTGTGATG
 ATGTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTTCATTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAA
 20 ACTACCTGGTGTATTTATTAATTTTGGAACTGTATGTGTGTGTCATACATCTTCATAGT
 TACGAGTTTAAGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGT
 TTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGA
 GTACCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTGATCTTGATATACTT
 GGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTA
 25 TTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTGCGATGCTCACCTGTTGTTTGGTGTTACTTC

TGCAG (SEQ ID NO: 8)

Casetes de expresión del gen indicador y transgén

5 La expresión transgénica puede también ser regulada por un casete de expresión génica. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor Ubi-1. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor Ubi-1 de una planta. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37, donde el promotor es idéntico en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 2. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor constitutivo, tal como el promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37, que se encuentra unido operativamente a un transgén o gen indicador. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor constitutivo que se encuentra unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de

tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de
5 estos. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor constitutivo puede conducir la expresión de uno o más transgenes o genes indicadores. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor constitutivo puede conducir la expresión de dos
10 o más transgenes o genes indicadores.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37, donde la secuencia promotora anterior es idéntica en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 4. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor constitutivo, tal como el promotor anterior Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37, que se encuentra unido operativamente a un
20 transgén o gen indicador. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor anterior constitutivo que se encuentra unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un
25 transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén

de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el

5 promotor anterior constitutivo puede conducir la expresión de uno o más transgenes o genes indicadores. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor anterior constitutivo puede conducir la expresión de dos o más transgenes o genes indicadores. En una

10 modalidad adicional, el promotor anterior puede comprender un intrón. En una modalidad, el promotor anterior puede comprender una secuencia de intrones que está unida de manera operativa a un transgén o gen indicador. En otra modalidad, el promotor anterior puede comprender una

15 secuencia líder o 5'-UTR. En una modalidad, el promotor anterior puede comprender una secuencia líder o 5'-UTR que está unida de manera operativa a un transgén o gen indicador. En aun otra modalidad, el promotor anterior puede comprender una secuencia líder o 5'-UTR y una secuencia de

20 intrones. En una modalidad, el promotor anterior puede comprender una secuencia líder o 5'-UTR y un intrón que están unidos de manera operativa a un transgén o gen indicador.

25 En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un

promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37, donde la secuencia líder o 5'-UTR es idéntica en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 6. En una modalidad, un

5 casete de expresión génica comprende una 5'-UTR o líder de un gen de maíz que codifica una proteína de Ubiquitina-1 que está unida de manera operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 o un promotor que tiene origen en una planta (por ejemplo, el

10 promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays*), un virus (por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende una secuencia líder o 5'-UTR de

15 *Z. mays* c.v. LLN37 de un gen de maíz que codifica una proteína de Ubiquitina que se encuentra unida de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso

20 de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

25 En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un

promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37, donde la secuencia intrónica es idéntica en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 8. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón de un gen de maíz que codifica una proteína de Ubiquitina-1 que está unida de manera operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 o un promotor que tiene origen en una planta (por ejemplo, el promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays*), un virus (por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un intrón de un gen de maíz que codifica una proteína de Ubiquitina que se encuentra unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, un vector puede comprender un casete de expresión génica como se describe en la presente. En una

modalidad, un vector puede ser un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un bacteriófago, un virus o un fragmento de polinucleótido extirpado para usar en la transformación directa o en el direccionamiento de genes tal como un ADN de donante.

En una modalidad, una célula o una planta comprende un casete de expresión génica tal como se describe en la presente. En una modalidad, una célula o una planta comprende un vector que comprende un casete de expresión génica tal como se describe en la presente. En una modalidad, un vector puede ser un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un bacteriófago o un virus. Por lo tanto, una célula o una planta que comprende un casete de expresión génica es una célula transgénica o una planta transgénica, respectivamente.

En una modalidad, una planta transgénica puede ser una planta monocotiledónea o dicotiledónea. Una modalidad de una planta transgénica monocotiledónea puede ser, de modo no taxativo, maíz, trigo, sorgo, avena, centeno, bananas, caña de azúcar y mijo. Una modalidad de una planta transgénica dicotiledónea puede ser, de modo no taxativo, soja, algodón, girasol o canola. Una modalidad también incluye una semilla transgénica de una planta transgénica, según se describe en

la presente.

Marcadores seleccionables

5 Varios marcadores seleccionables también descritos como genes indicadores se pueden incorporar en un vector de expresión elegido para permitir la identificación y la selección de plantas transformadas ("transformantes"). Hay disponibles muchos métodos para confirmar la expresión de marcadores seleccionables en plantas transformadas, inclusive, por ejemplo, la secuenciación de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transferencia Southern, transferencia de ARN, métodos inmunológicos para la detección de una proteína expresada del vector, tal como la proteína precipitada que media la resistencia de fosfinotricina, u observación visual de otras proteínas tales como genes indicadores que codifican la β -glucuronidasa (GUS), luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), proteína amarilla fluorescente (YPF), 15 DsRed, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), fosfatasa alcalina y similares (ver Sambrook, et ál., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001, cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad 25 mediante esta referencia).

Los genes marcadores seleccionables se utilizan para la selección de tejidos o células transformadas. Los genes marcadores seleccionables incluyen genes que codifican la
5 resistencia a antibióticos, tales como los que codifican neomicina fosfotransferasa II (NEO) y higromicina fosfotransferasa (HPT) así como también genes que confieren resistencia a compuestos herbicidas. Los genes de resistencia a herbicidas generalmente codifican para una
10 proteína objeto modificada que es insensible al herbicida o para una enzima que degrada o desintoxica al herbicida en la planta antes de que pueda actuar. Por ejemplo, la resistencia a glifosato se ha obtenido usando genes que codifican para enzimas objeto mutantes, 5-
15 enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Los genes y mutantes para EPSPS son bien conocidos y se describen en detalle a continuación. La resistencia al amonio de glufosinato, bromoxinilo y 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) ha sido obtenida usando genes bacterianos que codifican el
20 gen *pat* o *DSM-2*, una *nitrilasa*, un gen *aad-1* o un *aad-12*, que desintoxica los herbicidas respectivos.

En una modalidad, los herbicidas pueden inhibir el punto de crecimiento o meristemo, que incluyen imidazolinona o
25 sulfonilurea y genes para la resistencia/tolerancia de

acetohidroxiácido sintasa (AHAS) y acetolactato sintasa (ALS). Los genes de resistencia a glifosato incluyen 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSP) mutantes y genes *dgt-28* mediante la introducción de ácidos nucleicos recombina-
 5 tes y/o varias formas de mutagénesis *in vivo* de los genes EPSP nativos, genes *aroA* y genes glifosato acetiltransferasa (GAT), respectivamente. Los genes de resistencia para otros compuestos fosfono incluyen genes BAR de especies *Streptomyces*, inclusive *Streptomyces*
 10 *hygroscopicus* y *Streptomyces viridichromogenes* y ácidos propiónicos de fenoxi o piridinoxi y ciclohexonas (genes que codifican inhibidores de ACCasa). Los genes de ejemplo que confieren resistencia a ácido ariloxifenoxipropanóico y ciclohexanedionas (inclusive Haloxifop, Diclofop,
 15 Fenoxiprop, Fluazifop, Quizalofop) incluyen genes de acetil coenzima A carboxilasa (ACCasa)--*Acc1-S1*, *Acc1-S2* y *Acc1-S3*. En una modalidad, los herbicidas pueden inhibir la fotosíntesis, inclusive la triazina (genes *psbA* y *1s+*) o benzonitrilo (gen nitrilasa).

20

En una modalidad, los genes marcadores seleccionables incluyen, de modo no taxativo, genes que codifican: neomicina fosfotransferasa II; cianamida hidratasa; aspartato cinasa; dihidrodipicolinato sintasa; triptófano
 25 descarboxilasa; dihidrodipicolinato sintasa y aspartato

cinasa desensibilizada; gen bar; triptófano decarboxilasa; neomicina fosfotransferasa (NEO); higromicina fosfotransferasa (HPT o HYG); dihidrofolato reductasa (DHFR); fosfinotricina acetiltransferasa; dehalogenasa de ácido 2,2-dicloropropiónico; acetohidroxiácido sintasa; 5-enolpiruvil-shikimato-fosfate sintasa (aroA); haloarilnitrilasa; acetil-coenzima A carboxilasa; dihidropteroato sintasa (sul I); y polipéptido de fotosistema II de 32 kD (psbA).

10

Una modalidad también incluye genes que codifican resistencia a: cloranfenicol; metotrexato; higromicina; espectinomycinina; bromoxinilo; glifosato; y fosfinotricina.

15 La lista anterior de genes marcadores seleccionables no pretende ser taxativa. Se comprenden todos los genes marcadores seleccionables o indicadores en la presente invención.

20 Los genes marcadores seleccionables se sintetizan para la expresión óptima en una planta. Por ejemplo, en una modalidad, una secuencia que codifica un gen ha sido modificada por una optimización de codón para mejorar la expresión en las plantas. Un gen marcador seleccionable se
25 puede optimizar para la expresión en una especie de planta

particular o alternativamente se puede modificar para la expresión óptima en las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los codones preferidos de las plantas se pueden determinar a partir de de codones más frecuentes en las proteínas expresadas en la cantidad más grande en las especies de plantas de interés particulares. En una modalidad, un gen marcador seleccionable está diseñado para ser expresado en plantas a un nivel más alto, lo que resulta en una eficiencia de transformación mayor. Los métodos para la optimización vegetal de genes son bien conocidos. Las guías para la optimización y fabricación de secuencias sintéticas de polinucleótidos se pueden encontrar en, por ejemplo, W02013/016546, W02011/146524, W01997/013402, patente estadounidense n.º 6,166,302 y patente estadounidense n.º 5,380,831, incorporados a la presente mediante referencia.

Transgenes

Los métodos y composiciones descritos pueden utilizarse para la expresión de secuencias génicas de polinucleótidos dentro del genoma de la planta. Por consiguiente, los genes que codifican la tolerancia a herbicidas, resistencia a los insectos, nutrientes, antibióticos o moléculas terapéuticas se pueden expresar a través del promotor novedoso.

En una modalidad, el elemento regulador del promotor constitutivo de la presente descripción se combina o se une de manera operativa a uno o más genes que codifican 5 secuencias de polinucleótidos que proporcionan resistencia o tolerancia al glifosato, 2,4-D glufosinato u otro herbicida, proporcionan resistencia a enfermedades o insectos seleccionados y/o mejoras nutricionales, características agronómicas mejoradas, proteínas u otros 10 productos útiles para usos nutricionales, alimenticios, industriales, farmacéuticos u otros. Los transgenes pueden "apilarse" con dos o más secuencias de ácido nucleico de interés dentro del genoma de una planta. El apilamiento se puede lograr, por ejemplo, a través del fitomejoramiento 15 convencional de vegetales utilizando dos o más eventos de los siguientes: transformación de un vegetal con una construcción que contiene las secuencias de interés, retransformación de un vegetal transgénico, o adición de nuevos rasgos a través de la integración direccionada 20 mediante la recombinación homóloga.

Tales secuencias de polinucleótidos de interés incluyen, de modo no taxativo, los ejemplos proporcionados a continuación:

1. Genes o secuencia de codificación (por ejemplo, ARNi)
que confieren resistencia a plagas o enfermedades

(A) Genes Vegetales de Resistencia a Enfermedades. Las
5 defensas de los vegetales a menudo se activan por
interacción específica entre el producto de un gen de
resistencia a enfermedades (R) en el vegetal y el producto
de un gen de avirulencia correspondiente (Avr) en el
patógeno. Una variedad vegetal puede ser transformada con
10 el gen de resistencia clonado para crear vegetales que sean
resistentes a cepas patógenas específicas. Los ejemplos de
dichos genes incluyen, el gen Cf-9 del tomate para la
resistencia a *Cladosporium fulvum* (Jones et ál., 1994
Science 266:. 789), el gen Pto del tomate, que codifica una
15 proteína quinasa, para la resistencia a *Pseudomonas*
syringae pv. tomato (Martin et ál., 1993 Science 262:.
1432), y el gen RSSP2 de *Arabidopsis* para la resistencia a
Pseudomonas syringae (Mindrinos et ál., 1994 Cell 78:
1089).

20

(B) Una proteína de *Bacillus thuringiensis*, un derivado de
esta o un polipéptido sintético modelado sobre esta, como
por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de un gen de la
endotoxina d (Geiser et ál, 1986 Gen 48:. 109), y un gen de
25 insecticida vegetativo (VIP) gen (véase, por ejemplo,

Estruch et ál. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:5389-94).
Además, las moléculas de ADN que codifican genes de la
endotoxina d se pueden adquirir en American Type Culture
Collection (Rockville, Md.), bajo los números de acceso de
5 ATCC 40098, 67136, 31995 y 31998.

(C) Una lectina, tal como las secuencias de nucleótidos de
varios genes de lectina de unión a la manosa de *Clivia*
miniata (Van Damme et ál., 1994 Plant Molec. Biol. 24:825).

10

(D) Una proteína de unión a vitaminas, tal como avidina y
homólogos de avidina que son útiles como larvicidas contra
plagas de insectos. Véase patente estadounidense n.º
5,659,026.

15

(E) Un inhibidor enzimático, por ejemplo, un inhibidor de
proteasa o un inhibidor de amilasa. Ejemplos de dichos
genes incluyen un inhibidor de la cisteína proteinasa del
arroz (Abe et ál., 1987 J. Biol. Chem. 262: 16793), un
20 inhibidor I de la proteinasa del tabaco (Huub et ál., 1993
Plant Molec. Biol. 21:. 985), y un inhibidor de α -amilasa
(Sumitani et ál., 1993 Biosci. Biotech. Biochem. 57:1243).

(F) Una hormona específica de los insectos o una feromona
25 tal como un ecdiesterioide y una hormona juvenil y una

variante de estos, un mimético a base de estos, o un antagonista o agonista de estos, tal como, la expresión en baculovirus de la hormona juvenil clonada esterasa, un inactivador de la hormona juvenil (Hammock et ál., 1990
5 Nature 344:458).

(G) Un péptido o neuropéptido específico de los insectos que, después de la expresión, interrumpe la fisiología de la plaga afectada (J. Biol. Chem. 269:9). Los ejemplos de
10 dichos genes incluyen un receptor de la hormona diurética de los insectos (Regan, 1994), una alostatina identificada en *Diploptera punctata* (Pratt, 1989), y neurotoxinas paralíticas específicas de los insectos (patente estadounidense n.º 5,266,361).

15

(H) Un veneno específico de insectos producido en la naturaleza por una serpiente, una avispa, etc., tal como un péptido insectotóxico de escorpión (Pang, 1992 Gene 116:
165).

20

(I) Una enzima responsable de una hiperacumulación de monoterpeno, un sesquiterpeno, un esteroide, ácido hidroxámico, un derivado fenilpropanoide u otra molécula no
protéica con actividad insecticida.

25

(J) Una enzima involucrada en la modificación, inclusive la modificación postraducciona, de una molécula biológicamente activa; por ejemplo, enzima glicolítica, una enzima proteolítica, una enzima lipolítica, una nucleasa, una ciclasa, una transaminasa, una esterasa, una hidrolasa, una fosfatasa, una cinasa, una fosforilasa, una polimerasa, una elastasa, una quitinasa y una glucanasa, ya sean naturales o sintéticas. Los ejemplos de dichos genes incluyen, un gen de callasa (solicitud PCT publicada W093/02197), secuencias que codifican la quitinasa (que se pueden obtener, por ejemplo, en la ATCC con los números de acceso 3999637 y 67152), quitinasa del gusano del tabaco (Kramer et ál., 1993 Insect Molec. Biol. 23: 691), y el gen de poliUbiquitina ubi4-2 del perejil (Kawalleck et ál., 1993 Plant Molec. Biol. 21:673).

(K) Una molécula que estimula la transducción de señales. Los ejemplos de tales moléculas incluyen secuencias de nucleótidos para clones de ADNc de calmodulina de haba mungo (Botella et ál., 1994 Plant Molec. Biol. 24:757) y una secuencia de nucleótidos de un clon de ADNc de calmodulina de maíz (Griess et ál., 1994 Plant Physiol. 104:1467).

(L) Un péptido de momento hidrofóbico. Véanse las patentes

estadounidenses n.º 5,659,026 y 5,607,914; la última muestra péptidos antimicrobianos sintéticos que confieren resistencia a enfermedades.

- 5 (M) Una permeasa de membrana, un formador de canal o un bloqueador de canal, tales como un análogo lítico de péptidos de cecropina- β (Jaynes et ál., 1993 Plant Sci. 89:43) que hace a las plantas de tabaco transgénicas resistentes a las *Pseudomonas solanacearum*.

10

Una proteína viral invasiva o una toxina compleja derivada de ella. Por ejemplo, la acumulación de proteínas virales de cubierta en células vegetales transformadas proporciona resistencia a la infección viral y/o al desarrollo de

15 enfermedades efectuado por el virus del que deriva el gen de la proteína de cubierta, así como mediante virus relacionados. La resistencia mediada por proteínas de cubierta se ha conferido a plantas transformadas contra el virus del mosaico de la alfalfa, virus del mosaico del

20 pepino, virus estriado del tabaco, virus X de la papa, virus Y de la papa, virus del grabado del tabaco, virus cascabel del tabaco y virus del mosaico del tabaco. Véase, por ejemplo, Beachy et ál. (1990) Ann. Rev. Phytopathol. 28:451.

25

(O) Un anticuerpo específico de los insectos o una inmunotoxina derivada de este. De este modo, un anticuerpo direccionado a una función metabólica crítica en el intestino del insecto inactivaría una enzima afectada, matando al insecto. Por ejemplo, Taylor et ál. (1994) Resumen #497, Seventh Int'l. Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions muestra la inactivación enzimática en el tabaco transgénico mediante la producción de fragmentos de anticuerpos de cadena simple.

10

(P) Un anticuerpo específico de virus. Véase, por ejemplo, Tavladoraki et ál. (1993) Nature 266:469, que muestra qué plantas transgénicas que expresan genes de anticuerpos recombinantes están protegidas del ataque de virus.

15

(Q) Una proteína que detiene el desarrollo, producida en la naturaleza por un patógeno o un parásito. De este modo, las endo- α -1,4-D-poligalacturonasas fúngicas facilitan la colonización fúngica y la liberación de nutrientes vegetales al solubilizar la homo- α -1,4-D-galacturonasa de la pared celular del vegetal (Lamb et ál., 1992) Bio/Technology

10:1436. La clonación y caracterización de un gen que codifica una proteína inhibidora de endopoligalacturonasa de haba se describe por Toubart et ál. (1992 Plant J.

25

2:367).

(R) Una proteína que detiene el desarrollo producida en la naturaleza por un vegetal, tal como el gen inactivador del
 5 ribosoma de cebada que proporciona una mayor resistencia a enfermedades fúngicas (Logemann et ál. 1992). Bio/Technology 10:3305.

(S) Interferencia de ARN, en la que una molécula de ARN se
 10 utiliza para inhibir la expresión de un gen objetivo. Una molécula de ARN en un ejemplo tiene cadena doble parcial o totalmente, lo que desencadena una respuesta de silenciamiento, dando como resultado la escisión del RNAd en pequeños ARN de interferencia, que luego se incorporan
 15 en un complejo direccionado que destruye los ARNm homólogos. Véanse, por ejemplo, Fire et ál., patente estadounidense n.º 6,506,559; Graham et ál., patente estadounidense n.º 6,573,099.

20 2. Genes que confieren resistencia a un herbicida

Genes que codifican la resistencia o tolerancia a un herbicida que inhibe el punto de crecimiento o meristemo, tal como un herbicida de imidazolinona, sulfonanilida o
 25 sulfonilurea. Los genes de ejemplo en esta categoría

codifican el acetolactato sintasa mutante (ALS) (Lee et ál., 1988 EMBOL. 7:1241) también conocido como enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) (Miki et ál., 1990 Theor. Appl. Genet. 80:449).

5

(B) Uno o más genes adicionales que codifican la resistencia o tolerancia al glifosato impartidas por los genes de la sintasa EPSP mutante y genes aroA, o a través de la inactivación metabólica mediante genes tales como

10 DGT-28, 2mEPSPS, GAT (acetiltransferasa glifosato) o GOX (glifosato oxidasa) y otros compuestos de fosfono tales como glufosinato (genes pat, bar, y DSM-2), y ácidos ariloxifenoxipropionicos y ciclohexanodionas (genes que codifican el inhibidor de ACCasa). Véase, por ejemplo, la

15 patente estadounidense n.º 4,940,835, que describe la secuencia de nucleótidos de una forma de EPSP que puede conferir resistencia al glifosato. Una molécula de ADN que codifica un gen aroA mutante se puede obtener con el número de acceso de ATCC 39256, y la secuencia de nucleótidos del

20 gen mutante se describe en la patente estadounidense n.º 4,769,061. La solicitud de patente europea n.º 0 333 033 y la patente estadounidense n.º 4,975,374 describen secuencias de nucleótidos de genes de glutamina sintetasa que confieren resistencia a herbicidas tales como L-

25 fosfinotricina. La secuencia de nucleótidos de un gen de

fosfinotricinacetil-transferasa se proporciona en la solicitud de patente europea n.º 0 242 246. De Greef et ál. (1989) Bio/Technology 7:61, describe la producción de plantas transgénicas que expresan genes bar quiméricos que
 5 codifican la actividad de la fosfinotricinacetil-transferasa. Son ejemplos de genes que confieren resistencia a ácidos ariloxifenoxi propiónicos y a ciclohexanodionas, tales como setoxidim y haloxifop, los genes Acc1-S1, Acc1-
 10 S2 y Acc1-S3 descritos por Marshall et ál. (1992) Theor. Appl. Genet. 83:435.

(C) Genes que codifican la resistencia o tolerancia a un herbicida que inhibe la fotosíntesis, tal como una triazina
 15 (genes psbA y gs+) o un benzonitrilo (gen de nitrilasa). Przibilla et ál. (1991) Plant Cell 3:169 describe la transformación de Chlamydomonas con plásmidos que codifican genes psbA mutantes. Las secuencias de nucleótidos para genes de nitrilasa están descritas en la patente
 20 estadounidense n.º 4,810,648 y las moléculas de ADN que contienen estos genes están disponibles con los números de acceso de la ATCC 53435, 67441 y 67442. La clonación y expresión de ADN que codifica una glutatona S-transferasa se describe en Hayes et ál. (1992) Biochem. J. 285:173.

(D) Genes que codifican la resistencia o tolerancia a herbicidas que se unen a enzimas de hidroxifenilpiruvato dioxagenasa (HPPD), que catalizan la reacción en la cual el para-hidroxifenilpiruvato (HPP) se transforma en

5 homogentisato. Esti incluye herbicidas tales como isoxazolas (EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, patente estadounidense n.º 5,424,276), en particular isoxaflutola, que es un herbicida selectivo para el maíz, dicetonitrilos (EP496630, EP496631), en

10 particular 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃fenil)propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂fenil)propano-1,3-diona, tricetonas (EP625505, EP625508, patente estadounidense n.º 5,506,195), en particular sulcotriona y pirazolinatos. Un gen que

15 produce una sobreabundancia de HPPD en los vegetales puede proporcionar tolerancia o resistencia a dichos herbicidas, incluidos, por ejemplo, los genes descritos en las patentes estadounidenses n.º 6,268,549 y 6,245,968 y la publicación de la solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0066102.

20

(E) Genes que codifican la resistencia o tolerancia a los herbicidas de fenoxi auxina, tales como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y que también pueden conferir resistencia o tolerancia a herbicidas de

25 ariloxifenoxipropionato (AOPP). Los ejemplos de estos genes

incluyen el gen de la enzima dioxigenasa dependiente de -cetoglutarato (aad-1), que se describe en la patente estadounidense n.º 7,838,733.

5 (F) Genes que codifican la resistencia o tolerancia a los herbicidas de fenoxi auxina, tales como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y que también pueden conferir resistencia o tolerancia a herbicidas de auxina piridiloxi, tales como fluoroxipir o triclopir. Los ejemplos de dichos
10 genes incluyen el gen de la enzima dioxigenasa dependiente de a-cetoglutarato (add-12), que se describe en W02007/053482 A2.

(G) Genes que codifican la resistencia o tolerancia al
15 dicamba (véase por ejemplo, la publicación de la patente estadounidense N.º 20030135879).

(H) Genes que proporcionan resistencia o tolerancia a los herbicidas que inhiben la protoporfirinógeno oxidasa (PPO)
20 (véase la patente estadounidense n.º 5,767,373).

(I) Genes que proporcionan resistencia o tolerancia a los herbicidas de triazina (como la atriazina) y los herbicidas de derivados de la urea (como el diurón) que se unen a
25 proteínas nucleicas de centros de reacción del fotosistema

II (F II) (Véase Brussian et ál., (1989) EMBO J. 1989, 8(4): 1237-1245.

3. Genes que confieren o contribuyen a un rasgo de valor
5 agregado

(A) Modificación del metabolismo de ácidos grasos, por ejemplo, mediante la transformación del maíz o de Brassica con un gen antisentido o estearoil-ACP desaturasa para
10 aumentar el contenido de ácido esteárico del vegetal (Knultzon et ál., 1992) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:2624.

(B) Disminución del contenido de fitasa

15 (1) Introducción de un gen que codifica fitasa, tal como el gen de la fitasa de Aspergillus niger (Van Hartingsveldt et ál., 1993 Gene 127:87), aumenta la descomposición del fitato, agregando más fosfato libre al vegetal transformado.

20

(2) Un gen que reduzca el contenido de fitato podría ser introducido. En el maíz, esto, por ejemplo, podría llevarse a cabo mediante la clonación y luego la reintroducción de ADN asociado con el alelo único que es responsable de los
25 mutantes de maíz caracterizados por bajos niveles de ácido

fítico (Raboy et ál., 1990 Maydica 35:383).

(C) La modificación de la composición de carbohidratos efectuada, por ejemplo, mediante la transformación de
5 vegetales con un gen que codifica para una enzima que altera el patrón de ramificación del almidón. Los ejemplos de dichas enzimas incluyen genes de fructosiltransferasa *Streptococcus mucus* (Shiroza et ál., 1988) J. Bacteriol. 170:810, genes de levansucrasa *Bacillus subtilis* (Steinmetz
10 et ál., 1985 Mol. Gen. Genel. 200:220), α -amilasa *Bacillus licheniformis* (Pen et ál., 1992 Bio/Technology 10:292), genes de invertasa de tomate (Elliot et ál., 1993), gen de amilasa de la cebada (Sogaard et ál., 1993 J. Biol. Chem. 268:22480) y la enzima de ramificación de almidón de
15 endospermo de maíz II (Fisher et ál., 1993 Plant Physiol. 102:10450).

Transformación

20 Los métodos adecuados para la transformación de plantas incluyen cualquier método por el cual se pueda introducir ADN a una célula, por ejemplo y de modo no taxativo: electroporación (ver, por ejemplo, patente estadounidense 5,384,253); bombardeo de microprojectiles (ver, por ejemplo,
25 patentes estadounidenses 5,015,580, 5,550,318, 5,538,880,

6,160,208, 6,399,861 y 6,403,865); transformación mediada por *Agrobacterium* (ver, por ejemplo, patentes estadounidenses 5,635,055, 5,824,877, 5,591,616; 5,981,840 y 6,384,301) y transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, patente estadounidense 5,508,184). Estos métodos pueden utilizarse para transformar de manera estable o transformar de manera transitoria una planta.

Una construcción de ADN puede introducirse directamente en el ADN genómico de la célula vegetal mediante técnicas tales como agitación con fibras de carburo de silicio (véanse las patentes estadounidenses n.º 5,302,523 y 5,464,765). Las construcciones de ADN pueden introducirse directamente en el tejido vegetal mediante métodos biolísticos, tales como el bombardeo de partículas de ADN (véase, por ejemplo, Klein et ál., (1987) Nature 327:70-73). De manera alternativa, las construcciones de ADN se pueden introducir en la célula vegetal mediante transformación de nanopartículas (véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.º 2009/0104700, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia).

Además, la transferencia de genes se puede llevar a cabo usando virus o bacterias que no sean de *Agrobacterium* tales

como *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti*,
Mesorhizobium loti, virus X de la papa, virus del mosaico
de la coliflor, virus del mosaico de la vena de la yuca y/o
virus del mosaico de tabaco, véase, por ejemplo, Chung et
5 ál. (2006) *Trends Plant Sci.* 11(1):1-4.

A través de la aplicación de técnicas de transformación, las
células de prácticamente cualquier planta se pueden
transformar de manera estable y estas células se pueden
10 desarrollar en plantas transgénicas mediante técnicas bien
conocidas. Por ejemplo, las técnicas que pueden ser
particularmente útiles en el contexto de la transformación
de algodón se describen en las patentes estadounidenses
5,846,797, 5,159,135, 5,004,863 y 6,624,344; las técnicas
15 para transformar plantas *Brassica* en particular se
describen, por ejemplo, en la patente estadounidense
5,750,871; las técnicas para transformar la soja se
describen, por ejemplo, en la patente estadounidense
6,384,301; y las técnicas para transformar el maíz se
20 describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses
7,060,876 y 5,591,616 y en la publicación internacional PCT
W095/06722.

Después de realizar la administración de un ácido nucleico
25 exógeno a una célula receptora, se una célula transformada

es identificada generalmente para la regeneración vegetal y el cultivo adicional. Para mejorar la capacidad de identificar transformantes, se puede desear utilizar un gen marcador seleccionable con el vector de transformación usado
5 para generar el transformante. En una modalidad ilustrativa, una población de célula transformada se puede analizar mediante la exposición de las células a agentes selectivos, o las células se pueden analizar en búsqueda del rasgo de gen marcador deseado.

10

Las células que sobreviven a la exposición a un agente selectivo, o las células que han sido calificadas como positivas en un ensayo de análisis se pueden cultivar en un medio que tolerar la regeneración de plantas. En una
15 modalidad, cualquier medio de cultivo de tejido vegetal adecuado se puede modificar incluyendo sustancias adicionales, tales como reguladores de crecimiento. Los tejidos vegetales pueden mantenerse en un medio básico con reguladores de crecimiento hasta que esté disponible tejido
20 suficiente para comenzar los esfuerzos de regeneración de la planta. De manera alternativa, siguiendo repetidas veces de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea la adecuada para la regeneración (por ejemplo, al menos 2 semanas), el tejido puede transferirse al medio propicio de
25 formación de tallos. Los cultivos se transfieren

periódicamente hasta que se haya producido suficiente formación de tallos. Una vez que se hayan formado los tallos, se transfieren al medio propicio para la formación de raíces. Una vez que se hayan formado suficientes raíces,
5 las plantas pueden transferirse a la tierra para que crezcan y maduren.

Para confirmar la presencia de un ácido nucleico deseado que comprenda construcciones proporcionadas en la regeneración
10 de las plantas, se pueden realizar una variedad de ensayos. Dichos ensayos pueden incluir: ensayos biológicos moleculares, tales como la transferencia Southern y Northern y PCR; ensayos bioquímicos, tal como la detección de la presencia de un producto de proteína a través de medios
15 inmunológicos tal como ELISA, transferencias Western y/o espectrofotometría LC-MS MS) o mediante función enzimática, tales como, mediante ensayos de partes de plantas, tales como ensayos de hojas, callos o polen; y/o análisis del fenotipo de la planta regenerada completa.

20

Se pueden analizar los eventos transgénicos, por ejemplo, mediante la amplificación por PCR usando cebadores de oligonucleótidos específicos para las moléculas de ácido nucleico de interés. Se entiende que la genotipificación
25 incluye, de modo no taxativo, la amplificación por PCR del

ADN genómico derivado de los tejidos aislados y/o purificados de tejidos de plantas hospedadoras que se prevé que contengan una molécula de ácido nucleico de interés integrada en el genoma, seguido de la clonación estándar y
5 el análisis de secuencia de productos de amplificación por PCR. Los métodos de genotipificación por PCR han sido bien descritos (véase, por ejemplo, Rios et ál. (2002) Plant J. 32:243-53) y se pueden aplicar al ADN genómico derivado de cualquier especie vegetal o tipo de tejido, inclusive
10 cultivos celulares.

Las combinaciones de cebadores de oligonucleótido que unen tanto a la secuencia objeto como a la secuencia introducida se pueden usar secuencialmente o multiplexados en reacciones
15 de amplificaciones por PCR. Se pueden producir los cebadores de oligonucleótido diseñados para hibridarse al sitio objeto, secuencias de ácido nucleico introducidas y/o combinaciones de los dos tipos de secuencias de ácido nucleico. Por lo tanto, las estrategias de genotipificación
20 de PCR pueden incluir, por ejemplo y de modo no taxativo: amplificación de secuencias específicas en el genoma de la planta; amplificación de secuencias específicas múltiples en el genoma de la planta; amplificación de las secuencias no específicas en el genoma de la planta; y combinaciones de
25 cualquiera de los anteriores. Un experto en la técnica podrá

elaborar combinaciones adicionales de los cebadores y reacciones de amplificación para examinar el genoma. Por ejemplo, se puede diseñar un conjunto de cebadores de oligonucleótidos inversos y hacia adelante para hibridarse a las secuencias de ácido nucleico específicas para el objetivo fuera del límite de la secuencia de ácido nucleico introducida.

Los cebadores de oligonucleótido inversos y hacia adelante se pueden diseñar para hibridarse específicamente a una molécula de ácido nucleico introducida, por ejemplo, en una secuencia que corresponde a una región codificante dentro de una secuencia de nucleótidos de interés comprendida allí, u otras partes de la molécula de ácido nucleico. Los cebadores se pueden usar conjuntamente con cebadores descritos en la presente. Los cebadores de oligonucleótidos se pueden sintetizar de acuerdo con una secuencia deseada y están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA). La amplificación puede estar seguida de clonación y secuenciación, o mediante el análisis de secuencia directo de productos de amplificación. En una modalidad, los cebadores de oligonucleótidos específicos para direccionar genes se utilizan en amplificaciones por PCR.

Método para expresar un transgén

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que
5 comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 (SEQ ID NO: 2, unido de manera operativa a al menos un transgén.

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende
10 un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 (SEQ ID NO: 2, unido de manera operativa a al menos un transgén.

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que
15 comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 (SEQ ID NO: 2), unido de manera operativa a al menos un transgén. En otra modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende cultivar un
20 tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 (SEQ ID NO: 2), unido de manera operativa a al menos un transgén.

25 En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula

vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 (SEQ ID NO: 2), unido de manera operativa a un transgén. Donde el promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 (SEQ ID NO: 2) está

5 comprendido por un promotor anterior (SEQ ID NO: 4), una 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) y un intrón (SEQ ID NO: 8). En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor anterior de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 (SEQ ID NO: 4), una 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) y un intrón

10 (SEQ ID NO: 8). En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor anterior de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 (SEQ ID NO: 4), una 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) y un intrón

15 (SEQ ID NO: 8) de un gen Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor anterior de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 (SEQ ID NO: 4), una 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) y un intrón

20 (SEQ ID NO: 8) de un gen Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37. En una modalidad, un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 puede ser SEQ ID NO: 2. En una modalidad,

25

una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor, donde el promotor es idéntico en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 5 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 2. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor de Ubi-1 *Z. mays* c.v. LLN37 que está unido de manera operativa a un transgén. En una modalidad 10 ilustrativa, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor de Ubi-1 *Z. mays* c.v. LLN37 que está unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un 15 transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

20

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un promotor anterior de Ubi-1 *Z. mays* c.v. LLN37. En una modalidad, un promotor anterior de Ubi-1 de de *Z. mays* c.v. LLN37 puede ser la SEQ ID NO: 4.

25 En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una

célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor anterior, donde el promotor anterior es idéntico en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 4. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor anterior de Ubi-1 *Z. mays* c.v. LLN37 que está unido de manera operativa a un transgén. En una modalidad ilustrativa, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor anterior de Ubi-1 *Z. mays* c.v. LLN37, que está unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

20

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende una 5'-UTR de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 o secuencia líder. En una modalidad, una 5'-UTR de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 o secuencia líder puede ser un polinucleótido de la SEQ ID NO: 6. En una modalidad, una

25

planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR o una secuencia líder, donde el 5'-UTR o la secuencia líder son idénticos en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 6. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 o líder que está unido de manera operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor de ubiquitina o un promotor que se origina a partir de una planta (por ejemplo, el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays*), un virus (por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 o un líder que está unido de manera operativa a un transgén. En una modalidad ilustrativa, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR de Ubi-1 *Z. mays* c.v. LLN37 o un líder que está unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del

agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

- 5 En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un intrón de Ubi-1. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un intrón de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 En una modalidad, un intrón de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37
- 10 puede ser un polinucleótido de la SEQ ID NO: 8. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un intrón, donde el intrón es idéntico en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 15 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 8. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 que está unido de manera operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor de ubiquitina o un promotor que se origina a 20 partir de una planta (por ejemplo, el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays*), un virus (por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una 25 célula vegetal comprende un casete de expresión génica que

comprende un intrón de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 que está
unido de manera operativa a un transgén. En una modalidad
ilustrativa, una planta, un tejido vegetal o una célula
vegetal comprende un casete de expresión génica que
5 comprende un intrón de Ubi-1 *Z. mays* c.v. LLN37, que está
unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén
puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un
transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de
eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de
10 eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad
nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén
marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una
15 célula vegetal comprende un casete de expresión génica que
comprende un promotor anterior de Ubi-1 de *Z. mays* c.v.
LLN37, un intrón de Ubi-1 intrón, y una 5'-UTR Ubi-1 que
están unidos de manera operativa a un transgén. El promotor
de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37, el intrón de Ubi-1 y la 5'-
20 UTR de Ubi-1 pueden estar unidos de manera operativa a
diferentes transgenes dentro de un casete de expresión
génica cuando un casete de expresión génica incluye dos o
más transgenes. En una modalidad ilustrativa, un casete de
expresión génica comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. mays*
25 c.v. LLN37 que está unido de manera operativa a un

transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un
5 transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un intrón de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 que está unido de manera operativa a un transgén, donde el
10 transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén
15 marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 que está unido de manera operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor de ubiquitina o un promotor que se origina a
20 partir de una planta (por ejemplo, el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays*), un virus (por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión
25 génica comprende una 5'-UTR de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37,

que está unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un vector que comprende un elemento génico constitutivo regulador del promotor, tal como se describe en la presente. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un vector que comprende un elemento génico constitutivo regulador del promotor, tal como se describe en la presente, unido de manera operativa a un transgén. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un vector que comprende un casete de expresión génica, tal como se describe en la presente. En una modalidad, un vector puede ser un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un bacteriófago o un fragmento de virus.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal de acuerdo con los métodos que se describen

en la presente, puede ser una monocotiledónea. La planta monocotiledónea, tejido vegetal, célula vegetal, puede ser, de modo no taxativo, maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, cebada, centeno, sorgo, orquídea, bambú, banana, totora, 5 lirio, avena, cebolla, mijo y triticale. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal de acuerdo con los métodos que se describen en la presente, puede ser una dicotiledónea. La planta dicotiledónea, tejido vegetal o célula vegetal puede ser, de modo no 10 taxativo, colza, canola, mostaza india, mostaza etíope, soja, girasol y algodón.

Con respecto a la producción de plantas modificadas genéticamente, son conocidos en la técnica los métodos para 15 la modificación genética de las plantas. Por ejemplo, se han desarrollado numerosos métodos para la transformación de plantas, inclusive protocolos de transformación biológica y física para plantas dicotiledóneas, así como para plantas monocotiledóneas (por ejemplo, Goto-Fumiyuki et ál., *Nature Biotech* 17:282-286 (1999); Miki et ál., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. y Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 67-88 (1993)). Adicionalmente, se encuentran disponibles vectores y métodos de cultivo *in vitro* para la 25 transformación y regeneración de células o tejidos

vegetales de plantas, por ejemplo, en Gruber et ál., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. y Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 89-119 (1993).

5

El experto en la técnica reconocerá que luego de incorporar de forma estable la secuencia exógena en plantas transgénicas y confirmar que es operativa, puede ser introducida en otras plantas mediante cruzamiento sexual.

10 Puede usarse un gran número de técnicas estándares de fitomejoramiento, dependiendo de las especies que se pretenda cruzar.

Se puede identificar y aislar una célula vegetal, raíz,
15 hoja, callo, polen, tejido o planta transformados mediante la selección o análisis del material vegetal modificado para obtener rasgos codificados por los genes marcadores presentes en el ADN transformador. Por ejemplo, la selección puede realizarse mediante el cultivo del material
20 vegetal modificado en medios que contengan una cantidad inhibitoria del antibiótico o herbicida al cual ofrece resistencia la construcción génica transformadora. Además, las células transformadas también pueden ser identificadas mediante la selección de actividades de genes marcadores
25 visibles (por ejemplo, los genes YFP, GFP, β -glucuronidasa,

luciferasa, B o C1) que pueden estar presentes en construcciones recombinantes de ácido nucleico. Dichas metodologías de selección y análisis son conocidas para el experto en la materia.

5

Pueden usarse también métodos físicos y bioquímicos para identificar transformantes de plantas o de células vegetales que contienen construcciones génicas insertadas. Estos métodos incluyen, de modo no taxativo: 1) El análisis
10 Southern o la amplificación por PCR para detectar y determinar la estructura del inserto de ADN recombinante; 2) transferencia Northern, la protección de RNasa S1, la extensión del cebador o la amplificación por PCR con transcriptasa inversa para detectar y examinar las
15 transcripciones de ARN de las construcciones génicas; 3) los ensayos enzimáticos para detectar la actividad de la enzima o el ribosoma, donde dichos productos génicos están codificados por la construcción génica; 4) el análisis de secuenciación de la próxima generación (NGS); o 5) la
20 electroforesis de proteínas en gel, las técnicas de transferencia Western, la inmunoprecipitación o el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), donde los productos de la construcción génica son proteínas. Pueden usarse también técnicas adicionales, tales como hibridación
25 *in situ*, tinción de enzimas e inmunotinción, para detectar

la presencia o expresión de las construcciones recombinantes en órganos y tejidos vegetales específicos. Los métodos para llevar a cabo todos estos ensayos son conocidos para el experto en la técnica.

5

Pueden observarse los efectos de la manipulación genética mediante el uso de los métodos divulgados en la presente, a través de, por ejemplo, análisis transferencia Northern del ARN (por ejemplo, ARNm) aislado de los tejidos de interés.

10 Típicamente, si se encuentra presente el ARNm o la cantidad de ARNm ha aumentado, puede asumirse que el transgén correspondiente está siendo expresado. Pueden usarse otros métodos para la medición de la actividad genética y/o de polipéptidos codificados. Pueden usarse diferentes tipos de
15 ensayos enzimáticos, dependiendo del sustrato utilizado y el método para la detección del aumento o disminución de un producto o subproducto de reacción. Además, los niveles expresados de polipéptidos pueden medirse de forma inmunoquímica, empleando ELISA, RIA, EIA y otros ensayos
20 basados en anticuerpos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los ensayos de detección electroforética (ya sea por tinción o transferencia Western). Como un ejemplo no taxativo, se describe la detección de las proteínas AAD-1 (ariloxialcanoato
25 dioxigenasa; ver WO 2005/107437) y PAT (fosfinotricina-N-

acetiltransferasa) usando un ensayo ELISA en la publicación de patente estadounidense n.º 20090093366, la cual se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad. Además, el transgén puede expresarse de manera
5 selectiva en algunos tipos de células o tejidos de la planta o en algunas etapas del desarrollo. Además, el transgén puede expresarse sustancialmente en todos los tejidos vegetales y durante su ciclo de vida completo. No obstante, también es aplicable cualquier modo de expresión
10 combinatoria.

La presente descripción también abarca las semillas de plantas transgénicas descritas anteriormente, donde la semilla comprende un gen indicador, transgén o casete de
15 expresión génica. La presente divulgación abarca además la progenie, clones, líneas celulares o células de las plantas transgénicas descritas anteriormente, donde dicha progenie, clon, línea celular o célula comprende el gen indicador, transgén o la construcción génica.

20

Mientras que la invención ha sido descrita mediante referencia a métodos y modalidades específicos, debería ser evidente que pueden realizarse varias modificaciones y cambios sin desviarse de la invención descrita en la
25 presente.

EJEMPLOS**Ejemplo 1: Identificación y aislamiento del promotor novedoso**

5 Una secuencia de un promotor novedoso a partir del gen Ubi-1 de *Zea mays* c.v. LLN37 se amplificó usando la reacción de la cadena polimerasa PCR). Los oligonucleótidos (Tabla 1) diseñados para amplificar el promotor novedoso, de *Z. mays* c.v. LLN37, se derivaron de regiones conservadas de la
10 secuencia del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73, que sirvió como control. Se obtuvo un producto PCR a partir de *Z. mays* c.v. LLN37 y se caracterizó.

El producto PCR que comprendía el promotor novedoso se
15 clonó en vectores Topo™ usando un kit de clonación PCR Invitrogen Zero Blunt® TOP0® de conformidad con las instrucciones del fabricante. Se proporciona un mapa del vector que muestra el plásmido clonado que comprende el producto PCR del promotor novedoso. El plásmido pDAB105712
20 corresponde a *Z. mays* c.v. LLN37 (FIG. 2).

Tabla 1: Cebadores usados para la amplificación por PCR de los promotores de Ubi-1 novedosos

		Seq. ID No:
5	Cebador directo: GCTACCGCGG <u>ACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAATG</u>	9
	Cebador inverso: AGTCAGGTACCCTGCAGAAAGTAACACCAAACAACAG	10

10 La secuencia específica del promotor de los cebadores PCR está subrayada. La secuencia del cebador ubicada 5' hacia adelante de la secuencia específica del promotor es la secuencia enlazadora usada para la clonación.

Después de la clonación, el inserto del promotor que contenía el producto PCR se secuenció usando métodos conocidos para los expertos en la técnica. Las secuencias de polinucleótidos del promotor de *Z. mays* c.v. LLN37 (FIG. 4) fueron alineadas de manera computacional y posteriormente analizadas para obtener la homología de secuencia con respecto a la secuencia de control de Ubi-1 *Z. mays* c.v. B73 (FIG. 3). Se usaron métodos bioinformáticos y/o programas de software conocidos para los expertos en la técnica, tales como ClustalIW o Sequencher, para realizar el análisis de homología de la secuencia.

Ejemplo 2: Caracterización del promotor novedoso

El análisis de homología de la secuencia (FIGS. 3-7), incluidos el alineamiento y la comparación de la secuencia con respecto a la secuencia de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (SEQ ID NO: 1; FIG. 3) reveló un promotor novedoso de Ubi-1 para caracterización adicional. También se observó que la secuencia del nuevo promotor de Ubi-1, obtenido a partir de *Z. mays* c.v. LLN37 (SEQ ID NO: 2; FIG. 4), comprendía secuencias de polinucleótidos de tres regiones distintas; 1) una región del promotor anterior (SEQ ID NO: 4), 2) una 5'-UTR (SEQ ID NO: 6), y 3) un intrón (SEQ ID NO: 8). Las regiones del promotor y los elementos específicos del promotor de *Z. mays* c.v. LLN37 se analizaron para obtener la homología de la secuencia con respecto a la secuencia de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIGS. 5-7). Más específicamente, el alineamiento de la secuencia se realizó para comparar de manera independiente las regiones del promotor anterior, de la 5'-UTR y del intrón, así como los elementos reguladores de la caja TATA y el elemento de choque térmico (HSE) del promotor de *Z. mays* c.v. LLN37, con respecto a las regiones correspondientes de la secuencia de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIGS. 5-7, Tabla 2).

Tabla 2: Homología de la secuencia (%) entre el promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. y el promotor novedoso de Ubi-1

5							Elemento de choque término
	Promotor	Total	Promotor 5'- anterior	UTR/Líder	Intrón	Caja TATA	
	<i>Z. mays</i> c.v. LLN37	99.5	99.9	100	99	100	100

10

La FIG. 5 muestra el alineamiento de la secuencia de las regiones del promotor anterior del promotor de *Z. mays* c.v. LLN37, en comparación con la región del promotor anterior de la secuencia del promotor de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. La FIG. 6 muestra el alineamiento de la secuencia de la 5'-UTR o la secuencia líder del promotor de *Z. mays* c.v. LLN37, en comparación con la 5'-UTR o la secuencia líder de la secuencia del promotor de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. La FIG. 7 muestra el alineamiento de la secuencia de las regiones de intrones del promotor de *Z. mays* c.v. LLN37, en comparación con la secuencia de intrones de la secuencia del promotor de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73.

25 Los elementos del promotor obtenidos de *Z. mays* c.v. LLN37

mostraron una identidad de secuencia total de 99.5% (Tabla 2) con respecto a la secuencia de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. La caracterización de la secuencia del promotor novedoso de *Z. mays* c.v. LLN37 confirmó que la mayoría de los elementos reguladores del promotor (es decir, una caja TATA o un elemento de choque térmico) usualmente presentes en un promotor funcional, estaban también altamente conservados dentro de las regiones del promotor nuclear del promotor de *Z. mays* c.v. LLN37 (Tabla 2). Por ejemplo, la FIG. 5 muestra una caja TATA altamente conservada (pares de bases 869-876 que se muestran en *itálica y subrayado*) que se identificó y se encontró que estaba ubicada aproximadamente a 50bp 5' hacia adelante del TSS en la región del promotor anterior del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 novedoso. De manera similar, la FIG. 5 muestra dos secuencias superpuestas de elementos de choque térmico (HSE) (pares de bases 457-481 que se muestran en *subrayado* y 482-500 que se muestran con *subrayado doble*, respectivamente) se conservaron en el promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 Ubi-1 analizadas en este estudio y se ubicaban aproximadamente a 200bp 5' hacia adelante del TSS. Adicionalmente, un elemento regulador de 10 bp ubicado en la región anterior del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 (pares de bases 90-100 que se muestran *subrayados*) era idéntico en un 100% al mismo elemento encontrado en la

región del promotor anterior de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIG. 5).

Mientras que el 5'-UTR o la región líder del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 novedoso era idéntico en un 100% a la secuencia de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIG. 6), las áreas de menor conservación de la secuencia en la región del promotor anterior (FIG. 5) y la región del intrón (FIG. 7) se identificaron. Por ejemplo, las regiones del promotor anterior y del intrón del promotor de *Zea mays* c.v. LLN37 tenían una identidad de secuencia de 99.9% y 99% con respecto al promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73, respectivamente. En general, todas las regiones del promotor de *Zea mays* c.v. LLN37 estaban altamente conservadas en comparación con la secuencia del promotor de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (Tabla 2).

Además, existían motivos reguladores adicionales en la región del promotor anterior de Ubi-1 de *Z. mays* que se extiende a 100-200bp 5' hacia adelante del TSS. Estos motivos unen factores de transcripción que interactúan con el complejo de inicio de la transcripción y facilitan su montaje, mejoran su estabilidad, o aumentan la eficiencia del escape del promotor una vez que la maquinaria de transcripción se activa (PEREMARTI et ál. 2010). Por lo

tanto, las eliminaciones, sustituciones, y los desajustes dentro de esta región reguladora podrían potencialmente afectar tanto a la fuerza del promotor como a su especificidad.

5

Ejemplo 3: Construcción del vector usando nuevos promotores para la expresión génica

A menos que se indique lo contrario, las manipulaciones biológicas moleculares y bioquímicas descritas en este y los ejemplos posteriores, se realizaron mediante metodologías estándares como se describe en, por ejemplo, Ausubel et ál. (1995), y Sambrook et ál. (1989), y actualizaciones de estos. Las construcciones que se usan en los experimentos se describen en mayor detalle a continuación (Tabla 3).

Los promotores de *Z. mays* que comprenden las regiones del promotor anterior, 5'-UTR, y de intrones, tal como se describe anteriormente, se extrajeron a partir del gen Ubi-1 de las especies de *Z. mays* y los amplicones de PCR se purificaron en gel usando el Kit de Extracción de Gel QIAquick® (Qiagen Carlsbad, CA). La secuencia de polinucleótidos promotora se clonó a continuación en un Vector de Entrada Gateway® (Invitrogén) utilizando técnicas

de clonación estándares conocidas en la técnica. El Vector de Entrada Gateway® resultante que comprendía la secuencia promotora de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 se confirmó mediante digestión de restricción y secuenciación. Un

5 vector de entrada de control que comprendía la secuencia promotora de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 también se clonó en un vector de entrada gateway utilizando técnicas de clonación estándares conocidas en la técnica.

10 Además de las secuencias promotoras de Ubi-1, el vector de entrada también comprendía el gen indicador de la *proteína fluorescente amarilla* a partir de las especies *Phialidium PhiYFP*; Shagin, D. A., (2004) *Mol Biol Evol.* 21;841-50) con un intrón ST-LS1 incorporado a la secuencia (Vancanneyt,

15 G., (1990) *Mol Gen Genet.* 220;245-50) y la región 3'-UTR del gen de la *Zea mays* Peroxidasa 5 (*ZmPer5*; patente estadounidense n.º 6,699,984). Se proporcionan mapas de vectores que muestran los vectores de entrada clonados que comprenden cada secuencia promotora. La construcción

20 pDAB105742 corresponde al vector de entrada de control que comprende la secuencia promotora de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. La construcción pDAB105741 corresponde al vector de entrada de control que comprende la secuencia promotora de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37. Por lo tanto, se establecieron

25 los vectores de entrada que comprendían casetes de

expresión génica que comprendían un promotor de Ubi-1 *Z. mays*, el gen *PhiYFP*, y el *ZmPer5* 3'-UTR.

Tal como se describe en la Tabla 3, se diseñó una construcción de un vector de expresión binaria que comprendía un promotor de Ubi-1 *Z. mays*, el gen *PhiYFP*, y el *ZmPer5* 3'-UTR. Los vectores de transformación o expresión para la transformación de los embriones de maíz mediados por *Agrobacterium* se construyeron mediante el uso de métodos de clonación estándares y reacciones de recombinación Gateway®, empleando un vector binario de destino estándar, pDAB101917, y los vectores de entrada que comprendían los casetes de expresión génica, tal como se describe anteriormente.

El vector binario de destino, pDAB101917, comprendía un gen de tolerancia a herbicidas, *fosfinotricin acetiltransferasa* (PAT; Wehrmann et ál., 1996, Nature Biotechnology 14:1274-1278). En el vector pDAB101917, la expresión del gen PAT estaba bajo el control de un promotor de Ubi-1 de *Z. mays*, una 5'-UTR, y un intrón. El vector pDAB101917 también comprendía una región 3'-UTR del gen de *Z. mays* lipasa (*ZmLip*; patente estadounidense n.º 7,179,902). La 3'-UTR de *ZmLip* se usó para terminar la transcripción del ARNm de PAT. La reacción de recombinación Gateway® permitió la

inserción de cada vector de entrada que comprendía el casete de expresión génica (es decir, un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 o de *Z. mays* c.v. B73, el gen *PhiYFP*, y la 3'-UTR de *ZmPer5*) en el vector binario de destino pDAB101917. Los vectores de entrada se insertaron en el vector de destino pDAB101917 entre las fronteras A y B del ADN-T, y en la parte anterior del casete de expresión PAT.

Tabla 3: Construcción del vector binario de expresión génica

	Construcción del vector de entrada				Construcción del vector de destino			Figura
	Promotor	Tra 3'- nsg UTR én			Promo tor Gen indi cador	3'- UTR		
15 18	pDAB10574 8	<i>Z. mays</i> c.v. B73 Ubi-1	<i>Phi</i> YFP	<i>ZmPe</i> r5	<i>Z.</i> <i>mays</i> Ubi-1	PAT	<i>ZmLip</i>	8
20	pDAB10574 7	<i>Z. mays</i> c.v. LLN37 Ubi-1	<i>Phi</i> YFP	<i>ZmPe</i> r5	<i>Z.</i> <i>mays</i> Ubi-1	PAT	<i>ZmLip</i>	9

Se proporcionan mapas de los vectores que mostraron la construcción de expresión binaria, pDAB101917, con los

casetes de expresión génica compuestos de un promotor de Ubi-1 de *Z. mays*, el gen *PhiYFP*, y el *ZmPer5* 3'-UTR incorporados. La construcción de control, pDAB105748, corresponde al casete de expresión génica que comprende el promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIG. 8). Además, la construcción pDAB105747 corresponde al casete de expresión génica que comprende la secuencia promotora de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. LLN37 (FIG. 9).

10 Ejemplo 4: Transformación de la planta

Las construcciones de vectores binarios, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73) y pDAB105747 (*Z. mays* c.v. LLN37), fueron transformadas cada una en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, EHA101, usando técnicas de transformación estándares conocidas en la técnica. Se aislaron las colonias bacterianas y el ADN plasmídico binario se extrajo, purificó y confirmó mediante la digestión de la enzima de restricción.

20

La transformación de las plantas de maíz se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en Vega et al., 2008, Plant Cell Rep 27:297-305 que empleó transformación mediada por *Agrobacterium* y el gen de *fosfinotricin* acetiltransferasa (PAT; Wehrmann et ál., 1996, Nature

25

Biotechnology 14:1274-1278) como un marcador vegetal seleccionable. Se usaron cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* que comprendían las construcciones de vectores binarios (descritas anteriormente) para transformar las
5 plantas de *Z. mays* c.v. Hi-II y producir una primera tanda de eventos de maíz transgénico, T₀ (Tabla 4). Los embriones cigotos inmaduros se produjeron, prepararon y cosecharon 2.5 meses después de la transformación.

10 Los resultados de la transformación para las construcciones de expresión génica individuales se describen adicionalmente en la Tabla 4. Se describe la cantidad total de embriones producidos, la cantidad total de eventos transgénicos observados en la etapa de callos y en la
15 planta completa, así como el porcentaje de la eficiencia general de transformación. La eficiencia general de transformación de las construcciones de expresión binaria es menor que la que se informó previamente (Vega et al., 2008) debido a vigor embrionario pobre en varios
20 experimentos.

Tabla 4: Primera tanda, T ₀ , resultados de la transformación del maíz				
Construcción del vector binario	N.º total de embriones	Cantidad de callos	Número de eventos transgénicos	Eficiencia (%)
pDAB105748	545	221	33	6.1
pDAB105747	465	300	28	6.0

10 Ejemplo 5: Análisis del número de copias de transgenes

La integración estable del transgén *PhiYFP* dentro el genoma de las plantas transgénicas de *Z. mays* se confirmó mediante un ensayo de sonda de hidrólisis. Se obtuvieron plántulas transgénicas de *Z. mays* transformadas de forma estable que se desarrollaron a partir de los callos y se analizaron para identificar eventos que contuvieran un número bajo de copias (es decir, 1-2 copias) de insertos de cadena T de longitud completa.

20

Se utilizó el sistema Roche Light Cycl^{er}480™ para determinar el número de copias del transgén de conformidad con las instrucciones del fabricante. El método utilizó una reacción de PCR bíp^{lex} TaqMan® que empleó oligonucleótidos específicos para el gen *PhiYFP* y para el gen de referencia

25

endógeno, *Z. mays invertasa* (*ZmInv*; n.º de acceso Genbank: U16123.1), en un solo ensayo. Se determinaron el número de copias y la cigosidad mediante la medición de la intensidad de la fluorescencia específica de *PhiYFP* en relación con la fluorescencia específica de la *PhiYFP*, comparándolas con estándares de números de copias conocidos.

Se amplificó un fragmento de ADN de *PhiYFP* específico al gen con un conjunto de cebadores/sondas TaqMan® que contenía una sonda etiquetada con colorante fluorescente FAM™; se amplificó una *ZmInv* con un segundo conjunto de cebadores/sondas TaqMan® que contenía una sonda etiquetada con fluorescencia HEX™ (Tabla 5). Los cebadores y las sondas para el análisis del número de copias fueron sintetizadas comercialmente mediante Tecnología de ADN integradas (Coralville, IA). El resto fluorescente FAM™ se excitó a una densidad óptica de 465/510 nm, y el resto fluorescente HEX™ se excitó a una densidad óptica de 533/580 nm.

20

Las reacciones por PCR en un reacción de 10µl usando reactivos, tal como se describe en la Tabla 6. Los fragmentos específicos del ADN se amplificaron de conformidad con las condiciones de ciclo térmico establecidas en la Tabla 7. Se determinó el número de

25

copias y la cigosidad de las muestras mediante la medición de la intensidad relativa de la fluorescencia específica para el gen indicador, *PhiYFP*, con respecto a la fluorescencia específica para el gen de referencia, *ZmInv*,
5 en comparación con estándares de números de copias conocidos.

Los estándares de números de copias se crearon diluyendo el vector, pDAB108706, en el ADN genómico (ADNg) de *Z. mays*
10 c.v. LLN37 para obtener estándares con una relación conocida de pDAB108706:ADNg. Por ejemplo, se prepararon las muestras que tenían una, dos y cuatro copias de ADN vector cada una copia del ADNg de *Z. mays* LLN37. Se validaron disoluciones de una y dos copias de pDAB108706 mezcladas
15 con el estándar de ADNg de *Z. mays* LLN37 contra un evento de control de *Z. mays* que se sabía que era hemicigótico, y un evento de control de *Z. mays* que se sabía que era homocigótico (es decir, evento 278 de *Z. mays*; ver publicación internacional de patente PCT WO 2011/022469
20 A2).

Se realizó un ensayo de amplificación por PCR bípex TaqMan® que utilizó oligonucleótidos específicos para el gen PAT y para el gen de referencia endógeno, *Zm Inv*,
25 respectivamente. Se empleó amplificación por PCR para

detectar un fragmento de ADN específico del gen para PAT con un conjunto de cebadores TaqMan® y una sonda etiquetada con colorante fluorescente FAM™ (Tabla 5). Un segundo conjunto de cebadores y una sonda etiquetada con colorante fluorescente HEX™ también se usó para amplificar y detectar el gen de referencia/control endógeno *ZmInv* (Tabla 5). La mezcla de reacción TaqMan® de PAT se preparó según lo establecido en la Tabla 6, y los fragmentos específicos fueron amplificados según las condiciones establecidas en la Tabla 7.

Los resultados del análisis de número de copias del transgén de plantas transgénicas obtenidos mediante la transformación con diferentes construcciones de promotores se muestran en la Tabla 8. Únicamente se transfirieron al invernadero y se cultivaron las plantas con 1-2 copias del transgén de *PhiYFP* para análisis de expresión adicionales.

Tabla 5: Cebadores y sondas para ensayos del número de copias

			SEQ
			ID
5	Gen	Cebador/Sonda	Secuencia de nucleótidos
10	<i>PhiYFP</i>	Cebador hacia adelante	CGTGTTGGGAAAGAACTTGA
		Cebador inverso	CCGTGGTTGGCTTGGTCT
		Sonda (Etiqueta fluorescente/secuencia)	5' FAM/CACTCCCCACTGCCT
15	<i>ZmInv de control</i>	Cebador hacia adelante	TGGCGGACGACGACTTGT
		Cebador inverso	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT
		Sonda (Etiqueta fluorescente/secuencia)	5' HEX/CGAGCAGACCGCCGTGTAC TT
20	PAT	Cebador hacia adelante	ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAG AGGT
		Cebador inverso	CTTTGATGCCTATGTGACACGTAAA
		Sonda (Etiqueta fluorescente/secuencia)	5' FAM/GGTGTGTTGGCTGGTATTG CTTACGCTGG
25			

Tabla 6: Reactivos de la reacción por PCR del número de copias Taqman®

Reactivo	Concentración de sustancia	Volumen (µl)	Concentración final
Agua	--	0.5	--
Mezcla maestra Lightcycler de Roche	2X	5	1X
Cebador directo de <i>PhiYFP</i>	10µM	0,4	400 nM
Cebador inverso de <i>PhiYFP</i>	10µM	0,4	400 nM
Sonda etiquetada con FAM de <i>PhiYFP</i>	5 µM	0,4	200 nM
Cebador directo de <i>ZmInv</i>	10µM	0,4	400 nM
Cebador inverso de <i>ZmInv</i>	10µM	0,4	400 nM
Sonda etiquetada con HEX de <i>ZmInv</i>	5 µM	0,4	200 nM
Polivinilpirrolidona (PVP)	10%	0,1	0,10%
Molde de ADN genómico	~5ng/µl	2	10ng/µl

Tabla 7: Condiciones de ciclo térmico establecidas para la amplificación por PCR del número de copias

5	Etapa de			
	PCR	Temperatura (°C)	Tiempo	Cantidad de ciclos
10	1	95	10 minutos	1
	2	95	10 segundos	40
		58	35 segundos	
		72	1 segundo	
	3	40	10 segundos	1

Tabla 8: Análisis del número de copias de transgenes de plantas transgénicas

15	Construcción	Eventos	Simple	Complejo
		analizados	(1-2 copias)	(>2 copias)
	105748	21	15	6
	105747	23	15	8

Ejemplo 6: Cuantificación ELISA de las proteínas *PhiYFP* y

20 PAT

Las plantas se muestrearon en la etapa de desarrollo V4-5 mediante ensayos de hoja ELISA. Las muestras se tomaron en placas de tubo de 96 pocillos y se tomaron 4 discos de hoja
 25 (del tamaño de una perforación de hoja) para cada muestra.

Se agregaron a cada tubo dos BB de 4,5 mm (Daisy corporation, Roger, AR) y 200 μ L de amortiguador de extracción [1x PBS complementado con Tween®-20 al 0,05 % y BSA al 0,05 % (Millipore Probumin®, EMD Millipore Corp., Billerica, MA)]. Se agregaron a cada tubo 200 μ L adicionales de amortiguador de extracción seguidos de una inversión para mezclar. Se giraron las placas durante 5 minutos a 3000 rpm. Se transfirió el precipitado a los pocillos correspondientes en una placa deep well 96 almacenada en hielo. Se utilizaron para el ensayo ELISA placas Nunc® Maxi-Sorp de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). Se recubrieron las placas con anticuerpos monoclonales de captura anti-YFP de ratón (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD). Se diluyó el anticuerpo en PBS (1 μ g/mL) y se agregaron 150 μ L de PBS diluido por pocillo. Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas que se mantuvieron durante la noche se conservaron a temperatura ambiente durante 20-30 minutos antes de lavarlas 4x con 350 μ L de amortiguador de lavado [PBS 1x complementado con Tween®-20 al 0,05 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)].

Las placas se bloquearon con 200 μ L de amortiguador de bloqueo por pocillo [PBS 1x complementado con Tween®-20 al 0,05 % más BSA al 0,05 % (Millipore Probumin®)] durante un

mínimo de 1 hora a más de 37 °C, seguidos por un lavado 4x con 350 µL de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash™ 2, Tomtec, Inc., Hamden, CT).

5 Para el ELISA de YFP, se utilizó como estándar 1 mg/mL de Phi-YFP recombinante Evrogen (Axxora LLC, Farmingdale, NY). Se utilizó una curva estándar con un ajuste de 5 parámetros (entre los estándares de 1 ng/ml y 0,125 ng/ml) para asegurar que todos los datos se encontraran comprendidos
10 dentro de la parte lineal de la curva. Se agregó al pocillo 100 µL de estándar o muestra. Se utilizó una disolución mínima de 1:4 de la muestra en el amortiguador del ensayo. Se incubaron las placas durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador de placas (250 rpm; agitador Titer Plate)
15 seguido lavado 4x con 350 µL de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash™ 2). Se agregó a cada pocillo alrededor de 100 µL de anticuerpo primario policlonal anti-PhiYFP de conejo Evrogen (Axxora) a 1 µg/mL. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de
20 placas a 250 rpm seguido por lavado 4x con 350 µL de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash™ 2). Posteriormente, 100 µL de anticuerpo secundario anti-conejo IgG HRP (Thermo Scientific) se diluyeron en una relación 1:5000 de amortiguador de bloqueo/ensayo, y se
25 cuantificaron las proteína PAT usando un kit de Envirologix

(Portland, ME). Los ensayos ELISA se llevaron a cabo con múltiples diluciones de los extractos de plantas y con los reactivos e instrucciones proporcionados por los proveedores.

5

Ejemplo 7: Expresión vegetal estable del transgén unido de manera operativa a los promotores novedosos

Se observó la expresión de la proteína en tejidos vegetales transgénicos. Por ejemplo, se observó la expresión de *PhiYFP* en callos de las plantas T_0 que se transformaron de manera estable mediante el cocultivo con *Agrobacterium*. Las plantas transgénicas se cultivaron a partir de embriones de *Z. mays* transformados usando las construcciones de vectores binarios que comprendían el promotor novedoso, pDAB105747 (10 *Z. mays* c.v. LLN37, FIG. 9) y el promotor de control, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73, FIG. 8). Se observaron los callos vegetales con un microscopio esteroscópico (*Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL*) mediante un filtro de YPF (15 y con una fuente luminosa de 500 nm. Las muestras representativas de la expresión estable de *PhiYFP* observadas en el tejido de los callos de las plantas de maíz transgénico T_0 que comprendían pDAB105747 en comparación con de control, pDAB105748, se muestran en la (20 FIG. 10. Los datos confirman que el promotor novedoso que

25

comprendía pDAB105747 (*Z. mays* c.v. LLN37), tal como se describe en la presente, es capaz de conducir una expresión consistente del gen *PhiYFP* en el tejido de los callos de las plantas transgénicas T_0 .

5

Tal como se describe en la Tabla 8, las plantas completas que contenían un número de copias bajo (es decir 1-2 copias) del transgén *PhiYFP* se cultivaron en un invernadero. En general, se usaron alrededor de cinco (5) a
10 alrededor de diez (10) eventos por construcción y alrededor de cinco (5) plantas por evento para el análisis de expresión de T_1 . Los datos de ELISA revelaron una expresión consistente de la proteína *PhiYFP* en las hojas de las plantas de maíz T_1 usando construcciones de vectores que
15 comprendían el promotor novedoso, pDAB105747 (*Z. mays* c.v. 9), en comparación con el promotor de control, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73).

Una expresión promedio de la proteína *PhiYFP* de
20 aproximadamente 153.7 ng/mg (+/- 20.9 ng/mg) de *PhiYFP* se observó para las plantas T_1 que comprendían la construcción del promotor novedoso, pDAB105747 (*Z. mays* c.v. LLN37, FIG. 9), en comparación con aproximadamente 285.3 ng/mg (+/- 22.7 ng/mg) de la proteína *PhiYFP* producida por la planta
25 de control que comprendía la construcción de control,

pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73, FIG. 8). Estos resultados confirman que el promotor novedoso de *Z. mays* c.v. LLN37, tal como se describe en la presente, fue útil en la producción de rasgos transgénicos a niveles altos de
5 producción de proteínas.

Además, la expresión promedio de PAT para todas las plantas T_1 que comprendían pDAB105747 (*Z. mays* c.v. LLN37) fue aproximadamente de 73.2 ng/mg (+/- 6.8) en comparación con
10 aproximadamente 105.8 ng/mg (+/- 7.4 ng/mg) de la proteína PAT producida por la planta de control que comprendía pDAB105748 del promotor de *Z. mays* c.v. B73. En general, la expresión de la proteína PAT para todas las plantas de maíz fue significativamente más baja que la expresión observada
15 para el gen *PhiYFP* en las plantas de maíz.

La expresión de la proteína *PhiYFP* también se midió en el polen derivado de las borlas de plantas transgénicas T_1 seleccionadas que representaban cada una de las
20 construcciones de los promotores novedosos descritas en la presente. Tal como se muestra en la FIG. 11, el análisis de las imágenes del polen transgénico confirma que el promotor novedoso que comprendía pDAB105747 (*Z. mays* c.v. LLN37), tal como se describe en la presente solicitud, conduce la
25 elevada expresión de la proteína *PhiYFP* en el polen.

REIVINDICACIONES

5

Se reivindica lo siguiente:

1. Un casete de expresión génica que comprende un promotor unido de manera operativa a un transgén, donde el
10 promotor comprende un polinucleótido con una identidad de secuencia de al menos 90 % con la SEQ ID NO: 2.
2. El casete de expresión génica de la reivindicación 1, donde el promotor se hibrida en condiciones de rigurosidad
15 a una sonda de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con respecto a un complemento de la SEQ ID NO: 2.
3. El casete de expresión génica de la reivindicación 1,
20 donde el transgén unido de manera operativa codifica un polipéptido o ARN pequeño.
4. El casete de expresión génica de la reivindicación 1, donde el transgén se selecciona del grupo que consiste en
25 un transgén de resistencia insecticida, un transgén de tolerancia herbicida, un transgén de eficiencia en el uso

de nitrógeno, un transgén de eficacia del uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, y un transgén de marcador seleccionable.

5 5. El casete de expresión génica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una región no traducida 3'.

6. Un vector recombinante que comprende el casete de expresión génica de la reivindicación 1.

10

7. El vector recombinante de la reivindicación 6, donde el vector se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial bacteriano, un virus y un bacteriófago.

15

8. Una célula transgénica que comprende el casete de expresión génica de la reivindicación 1.

9. La célula transgénica de la reivindicación 8, donde la
20 célula transgénica es una célula vegetal transgénica.

10. Una planta transgénica que comprende la célula vegetal transgénica de la reivindicación 9.

25 11. La planta transgénica de la reivindicación 10, donde

la planta transgénica es una planta monocotiledónea o dicotiledónea.

12. La planta transgénica de la reivindicación 11, donde
5 la planta monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una planta de maíz, una planta de arroz y una planta de trigo.

13. Una semilla transgénica producida a partir de la
10 planta transgénica de la reivindicación 10.

14. Una célula transgénica que comprende un polinucleótido sintético con una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO: 2.

15

15. La célula transgénica de la reivindicación 14, donde el polinucleótido sintético se hibrida en condiciones de rigurosidad a una sonda de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con respecto a
20 un complemento de la SEQ ID NO: 2.

16. La célula transgénica de la reivindicación 14, donde la célula transgénica es una célula vegetal transgénica.

25 17. La célula transgénica de la reivindicación 16, donde

la célula vegetal transgénica se produce por un método de transformación vegetal.

18. La célula transgénica de la reivindicación 17, donde
5 el método de transformación vegetal se selecciona del grupo que consiste en un método de transformación mediada por *Agrobacterium*, un método de transformación de biolística, un método de transformación de carburo de silicio, un método de transformación de protoplasto, un método de
10 transformación de liposomas.

19. Una planta transgénica que comprende la célula vegetal transgénica de la reivindicación 14.

15 20. La planta transgénica de la reivindicación 19, donde la planta transgénica es una planta monocotiledónea.

21. La planta transgénica de la reivindicación 20, donde la planta monocotiledónea se selecciona del grupo que
20 consiste en una planta de maíz, una planta de arroz y una planta de trigo.

22. Una semilla transgénica producida a partir de la planta transgénica de la reivindicación 21.

23. Un vector recombinante que comprende el casete de expresión génica de la reivindicación 14.

24. El vector recombinante de la reivindicación 23, donde
5 el vector se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial bacteriano, un virus y un bacteriófago.

25. Un método para expresar una secuencia codificante
10 heteróloga en una planta transgénica, el método comprende:

a) transformar una célula vegetal con un casete de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 2 unida de
15 manera operativa a la secuencia codificante heteróloga, que está unida de manera operativa a una región no traducida 3';

b) aislar la célula vegetal transformada que comprende el
20 casete de expresión génica;

c) regenerar una célula vegetal transformada en una planta transgénica; y,

25 d) obtener la planta transgénica, donde la planta

transgénica comprende el casete de expresión génica que comprende la secuencia de polinucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 2.

5 26. El método de la reivindicación 25, donde la secuencia codificante heteróloga se selecciona del grupo que consiste en una secuencia codificante de resistencia insecticida, una secuencia codificante de tolerancia herbicida, una secuencia codificante de eficiencia en el uso de nitrógeno,
10 una secuencia codificante de eficacia del uso de agua, una secuencia codificante de calidad nutricional, una secuencia codificante de unión a ADN, y una secuencia codificante de marcador seleccionable.

15 27. El método de la reivindicación 25, donde transformar una célula vegetal es un método de transformación vegetal.

28. El método de la reivindicación 27, donde el método de transformación vegetal se selecciona del grupo que consiste
20 en un método de transformación mediada por *Agrobacterium*, un método de transformación de biolística, un método de transformación de carburo de silicio, un método de transformación de protoplasto, un método de transformación de liposomas.

29. El método de la reivindicación 25, donde la planta transgénica es una planta transgénica monocotiledónea o dicotiledónea.

5 30. El método de la reivindicación 29, donde la planta transgénica monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una planta de maíz, una planta de trigo y una planta de arroz.

10 31. Una semilla transgénica producida a partir de la planta transgénica de la reivindicación 25.

32. El método de la reivindicación 25, donde la secuencia codificante heteróloga se expresa en tejido vegetal
15 transgénico.

33. El método de la reivindicación 25, donde el tejido vegetal transgénico es una raíz, brote, tallo o polen de una planta transgénica.

20

34. Un método para aislar una secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO: 2, el método comprende:

25 a) identificar la secuencia de polinucleótidos que

comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID;

5 b) producir una pluralidad de secuencias de cebadores de oligonucleótidos, donde las secuencias de cebadores de oligonucleótidos se unen a la secuencia de polinucleótidos que comprenden una identidad de secuencia de al menos 90% con respecto a la SEQ ID;

10 c) amplificar la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con respecto a la SEQ ID a partir de una muestra de ADN con las secuencias de cebadores de oligonucleótidos seleccionadas de la pluralidad de secuencias de cebadores de
15 oligonucleótidos; y,

d) aislar la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID.

20

35. El método de la reivindicación 34, donde la secuencia de polinucleótidos aislada que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID N0: 2, está unida de manera operativa a un transgén.

25

36. El método de la reivindicación 35, donde el transgén unido de manera operativa codifica un polipéptido o ARN pequeño.

5 37. Una secuencia de polinucleótidos purificada que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con SEQ ID NO: 2, donde la secuencia de polinucleótido purificada promueve la expresión de un transgén.

10 38. La secuencia de polinucleótidos purificada de la reivindicación 37, donde una secuencia de sonda de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO: 2 se hibridiza en condiciones de rigidez a la secuencia de polinucleótidos purificada de la reivindicación 37.

39. La secuencia de polinucleótidos purificada de la reivindicación 37, donde la secuencia de polinucleótidos purificada está unida de manera operativa a un transgén.

20

40. El transgén unido de manera operativa de la reivindicación 39, donde el transgén unido de manera operativa codifica un polipéptido.

25 41. Un casete de expresión génica que comprende la

secuencia de polinucleótido purificada unida de manera operativa al transgén de la reivindicación 37, que está unido de manera operativa a la región no traducida 3'.

5 42. El casete de expresión génica de la reivindicación 41, donde el transgén se selecciona del grupo que consiste en un transgén de resistencia insecticida, transgén de tolerancia herbicida, transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, transgén de eficacia del uso de agua, transgén
10 de calidad nutricional, transgén de unión a ADN, y transgén de marcador seleccionable.

43. Un vector recombinante que comprende el casete de expresión génica de la reivindicación 41.

15

44. El vector recombinante de la reivindicación 43, donde el vector se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, un vector cósmido y un vector de BAC.

20 45. Una célula transgénica que comprende la secuencia de polinucleótidos purificada de la reivindicación 37.

46. La célula transgénica de la reivindicación 45, donde la célula transgénica es una célula vegetal transgénica.

25

47. Una planta transgénica que comprende la célula vegetal transgénica de la reivindicación 46.

48. La planta transgénica de la reivindicación 47, donde
5 la planta transgénica es una planta monocotiledónea.

49. La planta transgénica de la reivindicación 48, donde
la planta monocotiledónea se selecciona del grupo que
consiste en una planta de maíz, una planta de trigo y una
10 planta de arroz.

50. Una semilla transgénica producida a partir de la
planta transgénica de la reivindicación 49.

15 Buenos Aires, Diciembre de 2014.
pp. DOW AGROSCIENCES LLC.

Brígida Verónica Kapovic

20 Agente

1518

ASSIGNMENT BY INVENTORS

THIS ASSIGNMENT, made this 31st day of December, 2013, by Sandeep Kumar; Manju Gupta; Terry R. Wright; Susan M. Jayne; Doug A. Smith; and Diaa Alabed (hereinafter referred to as Assignors), residing at 201 Wyndotte Drive, Carmel, Indiana 46032; 13463 Winamac Court, Carmel, Indiana 46032; 14162 Charity Chase Circle, Carmel, Indiana 46074; 1962 Camargue Drive, Zionsville, Indiana 46077; 19038 Edwards Grove Drive, Noblesville, Indiana 46060; and 13310 Golden Gate Drive East, Carmel, Indiana 46074, respectively;

WHEREAS, Assignors have invented certain new and useful improvements in **NOVEL MAIZE UBIQUITIN PROMOTERS**, set forth in a Provisional application for Letters Patent of the United States, already filed on December 31, 2013 as U.S. Application No. 61/922,525; and

WHEREAS, Dow AgroSciences LLC, a Limited Liability Company organized under and pursuant to the laws of the State of Delaware having its principal place of business at 9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268 (hereinafter referred to as Assignee), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said inventions and said Application for Letters Patent of the United States, and in and to any Letters Patent of the United States to be obtained therefore and thereon.

NOW, THEREFORE, for good and valuable consideration and/or the remuneration received for my/our work and/or other good and sufficient consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, transferred and set over, and by these presents do sell, assign, transfer and set over, unto Assignee, its successors, legal representatives and assigns, the entire right, title and interest in and to the above-mentioned inventions and application for Letters Patent, and in and to any and all direct and indirect divisions, continuations and continuations-in-part of said application, and any and all Letters Patent in the United States and all foreign countries which may be granted therefore and thereon, and reissues, reexaminations and extensions of said Letters Patent, and all rights under the International Convention for the Protection of Industrial Property, the same to be held and enjoyed by Assignee, for its own use and benefit and the

use and benefit of its successors, legal representatives and assigns, to the full end of the term or terms for which Letters Patent may be granted and/or extended, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors, had this sale and assignment not been made.

AND for the same consideration, Assignors hereby represent and warrant to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that, at the time of execution and delivery of these presents, except for any rights, titles and/or interests that have arisen to Assignee under law or that have already been transferred to Assignee, Assignors are the sole and lawful owners of the entire right, title and interest in and to the said inventions and application for Letters Patent above-mentioned, and that the same are unencumbered and that Assignors have good and full right and lawful authority to sell and convey the same in the manner herein set forth.

AND for the same consideration, Assignors hereby covenant and agree to and with Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that Assignors will sign all papers and documents, take all lawful oaths and do all acts necessary or required to be done for the procurement, maintenance, enforcement and defense of any Letters Patent and applications for Letters Patent for said inventions, without charge to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, whenever counsel of Assignee, or counsel of its successors, legal representatives and assigns, shall advise: that any proceeding in connection with said inventions, or said Provisional application for Letters Patent, or any proceeding in connection with any Letters Patent or applications for Letters Patent for said inventions in any country, including but not limited to interference proceedings, is lawful and desirable; or, that any division, continuation or continuation-in-part of any application for Letters Patent, or any reissue, reexamination or extension of any Letters Patent, to be obtained thereon, is lawful and desirable.

AND Assignors hereby request the Commissioner for Patents and Trademarks to issue said Letters Patent of the United States to Assignee, as Assignee of said inventions and the Letters Patent to be issued thereon, for the sole use and benefit of Assignee, its successors, legal representatives and assigns.

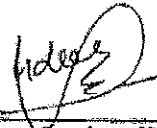
Application No.: 61/922,525
DAS No.: 75663-US-PSP

AND Assignors hereby grant the following individuals the power to insert on this Assignment any further identification which may be necessary or desirable in order to comply with the rules of the United States Patent and Trademark Office for recordation of this document:

DOW AGROSCIENCES LLC

All practitioners at Customer Number 107540

AND Assignors acknowledge an obligation of assignment of this invention to Assignee at the time the invention was made.



Sandeep Kumar

Date:

10/23/2014

United States of America

State of

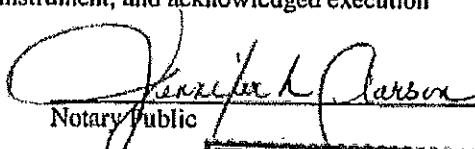
Indiana

ss.:

County of

Marion

On this 23rd day of October, 2014, before me
personally came Sandeep Kumar, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.



Notary Public



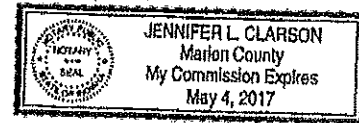
Manju Gupta
Manju Gupta

Date: 10-23-2014

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 23rd day of October, 2014, before me
personally came Manju Gupta, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Jennifer L. Clarkson
Notary Public



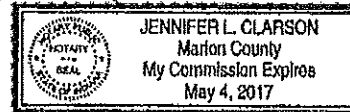
Terry R. Wright
Terry R. Wright

Date: 10/21/2014

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 21st day of October, 2014, before me
personally came Terry R. Wright, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Jennifer L. Clarkson
Notary Public

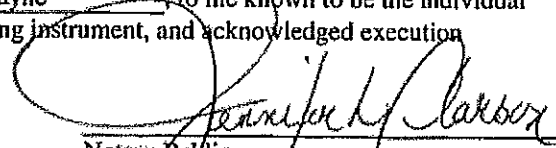


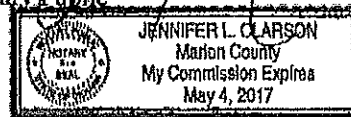

Susan M. Jayne

Date: 10/22/14

United States of America }
State of Indiana } ss.:
County of Marion

On this 22nd day of October, 2014, before me
personally came Susan M. Jayne to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.


Notary Public



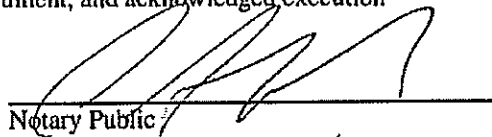


Doug A. Smith

Date: 11-13-14

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Hamilton)

On this 13th day of November, 2014, before me
personally came Doug A. Smith, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.


Notary Public

Resident of Hamilton County, Indiana
My commission expires 9-12-15

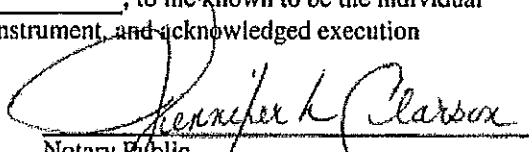


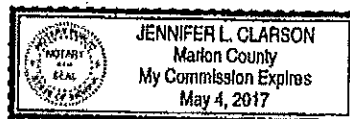

Diaa Alabed

Date: October 23, 2014

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 23rd day of October, 2014, before me
personally came Diaa Alabed, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.


Notary Public



TRADUCCIÓN SIMPLE AL ESPAÑOL REALIZADA POR MELISSA AGUDELO
MAGALHAES DE LOS SIGUIENTES DOCUMENTOS, ESCRITOS
ORIGINALMENTE EN INGLÉS.

Solicitud No.: 61/922,525
DAS No.: 75663-US-PSP

CESIÓN DE INVENTORES

LA PRESENTE CESIÓN, efectiva desde este día 31 de diciembre de 2013 por Sandeep Kumar; Manju Gupta; Terry R. Wright; Susan M. Jayne; Doug A. Smith; y Diaa Alabed (conocidos en adelante como los Cedentes), con domicilio en 201 Wyndotte Drive, Carmel, Indiana 46032; 13463 Winamac Court, Carmel, Indiana 46032; 14162 Charity Chase Circle, Carmel, Indiana 46074; 1962 Camargue Drive, Zionsville, Indiana 46077; 19038 Edwards Grove Drive, Noblesville, Indiana 46060; y 13310 Golden Gate Drive East, Carmel, Indiana 46074, respectivamente;

CONSIDERANDO QUE, los Cedentes han inventado una serie de mejoras nuevas y útiles en los **PROMOTORES NOVEDOSOS DE UBIQUITINA DE MAÍZ**, establecidas en una solicitud provisional de Título de Patente de los Estados Unidos, ya presentada el 31 de diciembre de 2013 como la solicitud de EE.UU. No. 61/922,525; y

CONSIDERANDO QUE, Dow AgroScience LLC, una sociedad de responsabilidad limitada constituida bajo y conforme a las leyes de Delaware, cuya sede principal se encuentra ubicada en 9330 Zionsville Road, Indianápolis, Indiana 46268 (conocido en adelante como el Cesionario), está interesada en adquirir todos los derechos, títulos, e intereses en y sobre dichas invenciones y dicha Solicitud de Títulos Patente de los Estados Unidos, y en relación a todos y cada uno de los Títulos Patente de los Estados Unidos que se obtengan a partir de y en relación con las mismas.

EN VIRTUD DE LO ANTERIOR, por contraprestación válida y onerosa y/o remuneración recibida por mi/nuestro trabajo y/o por otras contraprestaciones válidas y suficientes, cuyo recibo se reconoce por la presente, los Cedentes han vendido, cedido, transferido y pasado, y por la presente venden, ceden, transfieren y pasan al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, la totalidad de los derechos, títulos e intereses en relación a todas y cada una de las invenciones anteriormente mencionadas y la solicitud de Títulos de Patente, y en relación a todas y cada una de las divisiones, continuaciones y continuaciones parciales directas e indirectas de dicha solicitud, y todos y cada uno de los Títulos de Patente en los Estados Unidos y todos los países extranjeros que se obtengan a partir de y en relación a las mismas, y las reemisiones, reexaminación y extensiones de dichos Títulos Patente, así como todos los derechos de acuerdo a La Convención Internacional para la Protección de Propiedad Industrial, con los cuales también contará y gozará el Cesionario, para su propio uso y disfrute y para el uso y

disfrute de sus sucesores, representantes legales y cesionarios, durante todo el término o términos de los Títulos Patente otorgados y/o extendidos, de la misma manera y por el mismo tiempo que tendrían y disfrutarían los Cedentes si no hubiese ocurrido la presente venta y cesión.

Y por la misma consideración, por medio de la presente los Cedentes declaran y garantizan al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios que, en el momento de ejecución y entrega del presente documento, a excepción de los derechos, títulos y/o intereses surgidos para el Cesionario conforme a la ley o que ya han sido transferidos al Cesionario, los Cedentes son los únicos y legítimos propietarios de la totalidad de los derechos, títulos e intereses relacionados con dichas invenciones y solicitud de Títulos de Patente mencionados anteriormente, y que los mismos se encuentran libres de gravámenes y que los Cedentes están en todo su derecho y están autorizados a vender y traspasar los mismos de la manera establecida en este instrumento.

Y por la misma consideración, por medio de la presente los Cedentes aceptan y se comprometen con el Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, a firmar todos los papeles y documentos, a prestar todos los juramentos correspondientes y hacer todo lo necesario o exigido para obtener, mantener, hacer cumplir y defender cualesquiera de los Títulos de Patente y solicitudes de Títulos de Patente para dichas invenciones, sin ningún cargo al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, toda vez que el apoderado del Cesionario, o el apoderado de sus sucesores, representantes legales y cesionarios indiquen: que algún procedimiento relacionado con dichas invenciones, o dicha solicitud provisional para Título de Patente, o cualquier procedimiento relacionado a cualquier Título de Patente o solicitudes de Títulos de Patente para dichas invenciones en cualquier país, incluyendo, mas no limitado a, procedimientos de interferencia, es legítimo y deseable; o que cualquier división, continuación o continuación parcial de cualquier solicitud de Título Patente que se obtenga como resultado de las mismas es legítima y deseable.

Y por medio de la presente los Cedentes solicitan al Comisionado de Marcas y Patentes expedir dichos Títulos de Patente de los Estados Unidos al Cesionario, como Cesionario de dichas invenciones y de los Títulos Patente que se obtengan como resultado de las mismas, para el uso y beneficio exclusivo del Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios.

Y por medio de la presente los Cedentes autorizan a los siguientes individuos a adjuntar al presente documento de Cesión, cualquier tipo de identificación adicional que sea necesario o deseable para cumplir con las normas de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos para el registro de este documento:

DOW AGROSCIENCES LLC

Todos los profesionales con el Número de Cliente 107540

Y los Cedentes reconocen una obligación de cesión de esta invención al Cesionario en el momento en que se realizó la invención.

(firma ilegible)

Sandeep Kumar

Fecha: 23/10/2014

Estados Unidos de América)

Estado de Indiana) ss.:

Condado de Marion)

Este día 23 de octubre de 2014, compareció personalmente ante mí Sandeep Kumar, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(firma ilegible)

Notario Público

Sello:

JENNIFER L. CLARSON

Condado de Marion

Mi nombramiento vence el 4 de mayo de 2017

(firma ilegible)

Manju Gupta

Fecha: 23/10/2014

Estados Unidos de América)

Estado de Indiana) ss.:

Condado de Marion)

Este día 23 de octubre de 2014, compareció personalmente ante mí Manju Gupta, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(firma ilegible)

Notario Público

Sello:

JENNIFER L. CLARSON

Condado de Marion

Mi nombramiento vence el 4 de mayo de 2017

(firma ilegible)

Terry R. Wright

Fecha: 21/10/2014

Estados Unidos de América	)	
Estado de	)	Indiana
Condado de	)	Marion

ss.:

Este día 21 de octubre de 2014, compareció personalmente ante mí Terry R. Wright, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(firma ilegible)

Notario Público

Sello:

JENNIFER L. CLARSON

Condado de Marion

Mi nombramiento vence el 4 de mayo de 2017

(firma ilegible)

Susan M. Jayne

Fecha: 22/10/2014

Estados Unidos de América)
Estado de Indiana) ss.:
Condado de Marion)

Este día 22 de octubre de 2014, compareció personalmente ante mí Susan M. Jayne, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(firma ilegible)

Notario Público

Sello:

JENNIFER L. CLARSON

Condado de Marion

Mi nombramiento vence el 4 de mayo de 2017

(firma ilegible)

Doug A. Smith

Fecha: 13/11/2014

Estados Unidos de América)
Estado de Indiana) ss.:
Condado de Hamilton)

Este día 13 de noviembre de 2014, compareció personalmente ante mí Doug A. Smith, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(firma ilegible)

Notario Público

[Sello notarial del Estado de Indiana]

Residente del Condado de Hamilton, Indiana.
Mi nombramiento vence el 12-09-15

(firma ilegible)

Diaa Alabed

Fecha: 23 de octubre de 2014

Estados Unidos de América	)	
Estado de	)	Indiana
Condado de	)	Marion

 ss.:

Este día 23 de octubre de 2014, compareció personalmente ante mí Diaa Alabed, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(firma ilegible)

Notario Público

Sello:

JENNIFER L. CLARSON

Condado de Marion

Mi nombramiento vence el 4 de mayo de 2017

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35

BOGOTÁ, S - COLOMBIA

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)

Dow AgroSciences LLC

of/domiciliado (s) en 9330 Zionsville Road,
Indianapolis, Indiana 46268, United
States of America,

por el presente ratificamos la

presentada por

como agente oficioso ante

en

el 20 de mayo de 2009 y por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Consúl de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad,

hereby ratify the

filed without a Power of Attorney by

before

in

one, and do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of

A la vuelta →

Over →

© CAVELIER ABOGADOS
WPPODERE-21 (MINUTA N° 12.1.12.9.r USA)

medidas cautelares; concesión de licencias; la tutela, la protección, de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to these rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy _____

February 6, 1998

in/en Indianapolis, Indiana 46268

United States of America

Kenneth L. Loertscher
Signature _____ Firma _____

Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary
& General Patent Counsel



Señor Director

NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria Y Comercio

E. S. D.

Asunto : Solicitud de patente para: **PROMOTORES DE UBIQUITINA DE MAÍZ NOVEDOSOS**
PCT/US2014/072917

Solicitante : **DOW AGROSCIENCES LLC**

Yo, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, mayor de edad, domiciliada en Bogotá, D.C., identificada con la cédula de ciudadanía No. 35.456.344 de Usaquén y Tarjeta Profesional de Abogado número 23.555 del Consejo Superior de la Judicatura, obrando como apoderada de la sociedad **DOW AGROSCIENCES LLC**, mediante el presente escrito sustituyo el poder a ANDRES RINCON USCATEGUI, identificado con cédula de ciudadanía No. 79.780.910 de Bogotá, y Tarjeta Profesional No. 114.908 del Consejo Superior de la Judicatura, para que en nombre de la sociedad **DOW AGROSCIENCES LLC**, para presentar la solicitud de registro de la patente indicada en la referencia.

ANDRÉS RINCON USCATEGUI, queda facultado para interponer recursos, transigir, conciliar, desistir, cancelar, recibir, renunciar, sustituir y revocar las sustituciones, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Sírvase reconocerle personería en los términos y para los fines del presente mandato judicial.

Señor Director,


ADRIANA ZAPATA GIRALDO
C.C. No. 51.680.061 de Bogotá

Acepto:

ANDRES RINCON USCATEGUI
T.P.A. No. 114.908 del C.S. de la J
C.C. No. 79.780.910 de Bogotá

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

NCA/MMS/COLO-10975-841-342-0

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel: (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8850 - Fax in U.S.A: (1-806) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 852 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731 - COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DOW AGROSCIENCES LLC

5 <120> PROMOTORES DE UBIQUITINA DE MAÍZ NOVEDOSOS

<130> DAS-75663

<140>

10 <141>

<150> 61/922,525

<151> 2013-12-31

15 <160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

20 <211> 1993

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 1

25 gtgcagcgtg acccggtcgt gccctctct agagataatg agcattgcat gtctaagtta 60

taaaaaatta ccacatattt tttttgtcac acttgtttga agtgcagttt atctatcttt 120

atacatatat ttaaaccttta ctctacgaat aatataatct atagtactac aataatatca 180

30 gtgtttttaga gaatcatata aatgaacagt tagacatggt ctaaaggaca attgagtatt 240

ttgacaacag gactctacag tttttatctt ttagtggtgca tgtgttctcc tttttttttg 300

35 caaatagctt cacctatata atacttcac ctttttatta gtacatccat ttagggttta 360

gggttaatgg tttttataga ctaatttttt tagtacatct attttattct atttttagcct 420

ctaaattaag aaaactaaaa ctctatttta gtttttttat ttaatagttt agatataaaa 480

40 tagaataaaa taaagtgact aaaaattaaa caaataccct ttaagaaatt aaaaaaacta 540

aggaaacatt tttcttggtt cgagtagata atgccagcct gttaaagcgc gtcgacgagt 600

45 ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcagc gtcgctcgg gccaaagcaa gcagacggca 660

cggcatctct gtcgctgcct ctggaccct ctcgagagtt ccgctccacc gttggacttg 720

ctccgctgtc ggcatccaga aattgcgtgg cggagcggca gacgtgagcc ggcacggcag 780

50 gcggcctcct cctcctctca cggcaccggc agctacgggg gattcctttc ccaccgctcc 840

ttcgctttcc ctctctcgcc cgccgtaata aatagacacc ccctccacac cctctttccc 900

55 caacctcgtg ttgttcggag cgacacacaca cacaaccaga tctcccccac atccaccgt 960

cggcacctcc gcttcaaggt acgctgctcg tcctccccc cccccccct ctctaccttc 1020

tctagatcgg cggtccggtc catgcatggt tagggcccgg tagttctact tctgttcattg 1080

60 tttgtgttag atccgtgttt gtgttagatc cgtgctgcta gcgttcgtac acggatgcga 1140

cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa cttgccagtg tttctctttg gggaatcctg 1200

65 ggatggctct agccgttccg cagacgggat cgatttcattg attttttttg tttcgttgca 1260

tagggtttgg tttgccttt tcctttattt caatatatgc cgtgcacttg tttgtcgggt 1320

	catcttttca tgcttttttt tgtcttggtt gtgatgatgt ggtctggttg ggcggtcggt	1380
5	ctagatcgga gtagaattct gtttcaaact acctggtgga tttattaatt ttggatctgt	1440
	atgtgtgtgc catacatatt catagttacg aattgaagat gatggatgga aatatcgatc	1500
	taggataggt atacatgttg atgcgggttt tactgatgca tatacagaga tgctttttgt	1560
10	tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggttg ggcggtcggt cattcgttct agatcggagt	1620
	agaatactgt ttcaaactac ctggtgtatt tattaatttt ggaactgtat gtgtgtgtca	1680
15	tacatcttca tagttacgag tttaatagtg atggaaatat cgatctagga taggtataca	1740
	tgttgatgtg ggttttactg atgcataatac atgatggcat atgcagcatc tattcatatg	1800
	ctctaacctt gagtacctat ctattataat aaacaagtat gttttataat tatttcgatc	1860
20	ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt ggattttttt agccctgcct	1920
	tcatacgcta tttatttgct tgggtactgtt tcttttgcg atgctcaccg tgttggttg	1980
25	tgttacttct gca	1993
	<210> 2	
	<211> 1977	
	<212> ADN	
30	<213> Zea mays	
	<400> 2	
	gaccggtcg tgcccccttc tagagataat gagcattgca tgtctaagtt ataaaaaatt	60
35	accacatatt ttttttgtca cacttggttg aagtgcagtt tatctatctt tatacatata	120
	tttaaacctt actctacgaa taatataatc tatagtacta caataatatac agtgttttag	180
40	agaatcatat aaatgaacag ttagacatgg tctaaaggac aattgagtat ttgacaaca	240
	ggactctaca gttttatctt tttagtgtgc atgtgttctc cttttttttt gcaaataagct	300
	tcacctatat aatacttcat ccattttatt agtacatcca tttagggttt aggggtaatg	360
45	gtttttatag actaatTTTT ttagtacatc tattttattc tatttttagcc tctaaattaa	420
	gaaaactaaa actctatTTT agttttttta ttttaataatt tagatataaa atagaataaa	480
50	ataaagtgac taaaaattaa acaaataccg ttttaagaaat taaaaaaact aaggaaacat	540
	ttttcttggt tcgagtagat aatgccagcc tgttaaacgc cgtcgacgag tctaaccggac	600
	accaaccagc gaaccagcag cgtcgcgtcg ggccaagcga agcagacggc acggcatctc	660
55	tgtcgtgccc tctggacccc tctcgagagt tccgctccac cggttgactt gctccgctgt	720
	cggcatccag aaattgcgtg gcggagcggc agacgtgagc cggcacggca ggcggcctcc	780
60	tcctcctctc acggcaccgg cagctacggg ggattccttt ccaccgctc cttcgctttc	840
	ccttcctcgc ccgccgtaat aaatagacac cccctccaca ccctctttcc ccaacctcgt	900
	gttggtcgga gcgcacacac acacaaccag atctcccca aatccaccg tcggcacctc	960
65	cgcttcaagg tacgccgctc gtcctcccc ccccccctc taccttctct agatcggcgt	1020
	tccggtccat ggtagggcc cggtagtctt acttctgttc atgtttgtgt tagatccgtg	1080

	tttgtgttag atccgtgctg ctagcggttcg tacacggatg cgacctgtac gtcagacacg	1140
5	ttctgattgc taacttgcca gtgtttctct ttggggaatc ctgggatggc tctagccgtt	1200
	ccgcagacgg gatcgatttc atgatttttt ttgtttcgtt gcataggggtt tggtttgccc	1260
	ttttccttta tttcaatata tgccgtgcac ttgtttgtcg ggtcatcttt tcatgctttt	1320
10	ttttgtcttg gttgtgatga tgtggtctgg ttgggcggtc gttctagatc ggagtagaat	1380
	tctgtttcaa actacctggt ggatttatta attttggatc tgtatgtgtg tgccatacat	1440
15	attcatagtt acgaattgaa gatgatggat ggaaatatcg atctaggata ggtatacatg	1500
	ttgatgcggg ttttactgat gcatatacag agatgctttt tgttcgcttg gttgtgatga	1560
	tgtggtgtgg ttgggcggtc gttcattcgt tctagatcgg agtagaatac tgtttcaaac	1620
20	tacctggtgt atttattaat tttggaactg tatgtgtgtg tcatacatct tcatagttac	1680
	gagttaaaga tggatggaaa tatcgatcta ggataggtat acatgttgat gtgggtttta	1740
25	ctgatgcata tacatgatgg catatgcagc atctattcat atgctctaac cttgagtacc	1800
	tatctattat aataaacaag tatgttttat aattattttg atcttgatat acttggatga	1860
	tggcatatgc agcagctata tgtggatttt tttagccctg ccttcatacg ctattttatt	1920
30	gcttggtact gtttcttttg tcatgctca ccctgttggt tgggtgttact tctgcag	1977
	 <210> 3	
	<211> 896	
35	<212> ADN	
	<213> Zea mays	
	 <400> 3	
40	gtgcagcgtg acccggtcgt gccctctct agagataatg agcattgcat gtctaagtta	60
	taaaaaatta ccacatattt tttttgtcac acttgtttga agtgcagttt atctatcttt	120
	atacatatat ttaacttta ctctacgaat aatataatct atagtactac aataatatca	180
45	gtgtttttaga gaatcatata aatgaacagt tagacatggt ctaaaggaca attgagtatt	240
	ttgacaacag gactctacag ttttatcttt ttagtgtgca tgtgttctcc ttttttttg	300
	caaatagctt cacctatata atacttcac cattttatta gtacatccat ttagggttta	360
50	gggttaatgg tttttataga ctaatttttt tagtacctt attttattct attttagcct	420
	ctaaattaag aaaactaaaa ctctatttta gtttttttat ttaatagttt agatataaaa	480
55	tagaataaaa taaagtgact aaaaattaaa caaataccct ttaagaaatt aaaaaaacta	540
	aggaaacatt tttcttggtt cgagtagata atgccagcct gttaaagcgc gtcgacgagt	600
	ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcagc gtcgctcgg gccaaagcga gcagacggca	660
60	cggcatctct gtcgctgcct ctggaccct ctcgagagtt ccgctccacc gttggacttg	720
	ctccgctgtc ggcattcaga aattgcgtgg cggaagcgca gacgtgagcc ggcacggcag	780
65	gcggcctcct cctcctctca cggcaccggc agctacgggg gatttccttt ccaccgctcc	840
	ttcgctttcc cttcctcgcc cgccgtaata aatagacacc ccctccacac cctctt	896

5 <210> 4
 <211> 887
 <212> ADN
 <213> Zea mays

10 <400> 4
 gacccggtcg tgcccctctc tagagataat gagcattgca tgtctaagtt ataaaaaatt 60
 accacatatt ttttttgtca cacttgtttg aagtgcagtt tatctatctt tatacatata 120
 tttaaacttt actctacgaa taatataatc tatagtacta caataatata agtggttttag 180
 15 agaatcatat aaatgaacag ttagacatgg tctaaaggac aattgagtat tttgacaaca 240
 ggactctaca gttttatctt tttagtgtgc atgtgttctc cttttttttt gcaaatagct 300
 tcacctatat aatacttcat ccattttatt agtacatcca tttagggttt aggggttaatg 360
 20 gtttttatag actaattttt ttagtacatc tattttattc tatttttagcc tctaaattaa 420
 gaaaactaaa actctatttt agttttttta ttttaataatt tagatataaa atagaataaa 480
 25 ataaagtgc taaaaattaa acaaatatcc ttttaagaaat taaaaaaact aaggaaacat 540
 ttttcttggt tcgagtagat aatgccagcc tgtaaagcgc cgtcgacgag tctaacggac 600
 accaaccagc gaaccagcag cgtcgctgcg ggccaagcga agcagacggc acggcatctc 660
 30 tgtcgctgcc tctggacccc tctcgagagt tccgctccac cggttgactt gctccgctgt 720
 cggcatccag aaattgcgtg gcggagcggc agacgtgagc cggcacggca ggcggcctcc 780
 35 tcctcctctc acggcaccgg cagctacggg ggattccttt cccaccgctc cttcgctttc 840
 ccttcctcgc ccgccgtaat aaatagacac cccctccaca ccctctt 887

40 <210> 5
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> Zea mays

45 <400> 5
 tccccaacct cgtgtgtgtc ggagcgcaca cacacacaac cagatctccc ccaaattccac 60
 ccgtcggcac ctccgcttca ag 82

50 <210> 6
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> Zea mays

55 <400> 6
 tccccaacct cgtgtgtgtc ggagcgcaca cacacacaac cagatctccc ccaaattccac 60
 ccgtcggcac ctccgcttca ag 82

60 <210> 7
 <211> 1015
 <212> ADN
 <213> Zea mays

65 <400> 7

	gtacgccgct cgtcctcccc ccccccccc ctctctacct tctctagatc ggcgttcg	60
	tccatgcatg gttagggccc ggtagttcta cttctgttca tgtttgtgtt agatccgtgt	120
5	ttgtgttaga tccgtgctgc tagcgttcgt acacggatgc gacctgtacg tcagacacgt	180
	tctgattgct aacttgccag tgtttctctt tggggaatcc tgggatggct ctagccgttc	240
10	cgcagacggg atcgatttca tgattttttt tgtttcgtt cataggggtt gggttgccct	300
	tttcctttat ttcaatatat gccgtgcact tgtttgtcgg gtcactcttt catgcttttt	360
	tttgtcttgg ttgtgatgat gtggtctggt tgggcggctg ttctagatcg gagtagaatt	420
15	ctgtttcaaa ctacctggtg gatttattaa ttttggatct gtatgtgtgt gccatacata	480
	ttcatagtta cgaattgaag atgatggatg gaaatatcga tctaggatag gtatacatgt	540
20	tgatgcgggt tttactgatg catatacaga gatgcttttt gttcgcttgg ttgtgatgat	600
	gtggtgtggt tgggcggctg ttcattcgtt ctagatcgga gtagaatact gtttcaaact	660
	acctggtgta tttattaatt ttggaactgt atgtgtgtgt catacatctt catagttacg	720
25	agttaaagat ggatggaaat atcgatctag gataggata catgttgatg tgggttttac	780
	tgatgcatat acatgatggc atatgcagca tctattcata tgctctaacc ttgagtacct	840
30	atctattata ataaacaagt atgttttata attatttcga tcttgatata cttggatgat	900
	ggcatatgca gcagctatat gtggatTTTT ttagccctgc cttcatacgc tatttatTTg	960
	cttggTactg tttcttttTg cgatgctcac cctgttTgtt ggtgttactt ctgca	1015
35	<210> 8 <211> 1008 <212> ADN <213> Zea mays	
40	<400> 8 gtacgccgct cgtcctcccc cccccctct ctaccttctc tagatcggcg ttccggtcca	
	60	
45	tggttagggc ccggtagttc tacttctgtt catgtttgtg ttagatccgt gtttgtgtta	120
	gatccgtgct gctagcgttc gtacacggat gcgacctgta cgtcagacac gttctgattg	180
	ctaacttgcc agtgtttctc tttggggaat cctgggatgg ctctagccgt tccgcagacg	240
50	ggatcgattt catgattttt tttgtttcgt tgcatagggg ttggtttgcc cttttccttt	300
	atttcaatat atgccgtgca cttgtttgtc gggtcactct ttcattgcttt tttttgtctt	360
55	ggttgtgatg atgtggtctg gttgggcggg cgttctagat cggagtagaa ttctgtttca	420
	aactacctgg tggatttatt aattttggat ctgtatgtgt gtgccataca tattcatagt	480
	tacgaattga agatgatgga tggaaatatc gatctaggat aggtatacat gttgatgcgg	540
60	gttttactga tgcatataca gagatgcttt ttgttcgctt ggttgtgatg atgtggtgtg	600
	gttgggcggg cgttcattcg ttctagatcg gagtagaata ctgtttcaaa ctacctggtg	660
65	tatttattaa ttttggaaact gtatgtgtgt gtcatacatc ttcatagtta cgagttaaag	720
	atggatggaa atatcgatct aggataggta tacatgttga tgtgggtttt actgatgcat	780

	atacatgatg gcatatgcag catctattca tatgctctaa ccttgagtac ctatctatta	840
	taataaaciaa gtatgtttta taattatttt gatcttgata tacttggatg atggcatatg	900
5	cagcagctat atgtggattt ttttagccct gccttcatac gctatttatt tgcttggtac	960
	tgtttctttt gtcgatgctc accctgttgt ttggtgttac ttctgcag	1008
10	<210> 9 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 9 gctaccgagg acccggtcgt gccctctct agagataatg	40
20		
	<210> 10 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25		
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
30	<400> 10 agtcaggtag cctgcagaag taacacaaaa caacag	36
35	<210> 11 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 11 cgtgttgga aagaacttgg a	21
45		
	<210> 12 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50		
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
55	<400> 12 ccgtggttgg cttgtct	18
60	<210> 13 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: sonda artificial	

```

<220>
<223> 5'FAM

5   <400> 13
    cactcccccac tgcct                                     15

    <210> 14
    <211> 18
10  <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético
15
    <400> 14
    tggcggacga cgacttgt                                     18

    <210> 15
    <211> 19
20  <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético
25
    <400> 15
    aaagtttgga ggctgccgt                                     19
30

    <210> 16
    <211> 21
    <212> ADN
35  <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Descripción de secuencia artificial: sonda artificial

    <220>
    <223> 5'HEX
40

    <400> 16
    cgagcagacc gccgtgtact t                                     21
45

    <210> 17
    <211> 29
    <212> ADN
50  <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

    <400> 17
55  acaagagtgg attgatgatac tagagaggt                                     29

    <210> 18
    <211> 29
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético
65
    <400> 18

```

	ctttgatgcc tatgtgacac gtaaacagt	29
5	<210> 19 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: sonda artificial	
	<220> <223> 5'FAM	
15	<400> 19 ggtggtgtgg ctggtattgc ttacgctgg	29

RESUMEN

El promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays* c.v. B73 (Ubi-1 de
5 *Z. mays* c.v. B73) conduce a niveles altos de la expresión
de transgenes constitutivos en plantas. El uso repetido de
los mismos promotores de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 en
construcciones génicas múltiples también puede llevar a el
silenciamiento génico, haciendo de ese modo menos eficaces
10 a los productos transgénicos. Se proporcionan elementos
génicos reguladores del promotor, construcciones y métodos
de expresión de un transgén en células vegetales y/o
tejidos vegetales usando elementos génicos reguladores del
promotor de Ubi-1 de un genotipo diferente de *Z. mays*, *Z.*
15 *mays* c.v. LLN37.

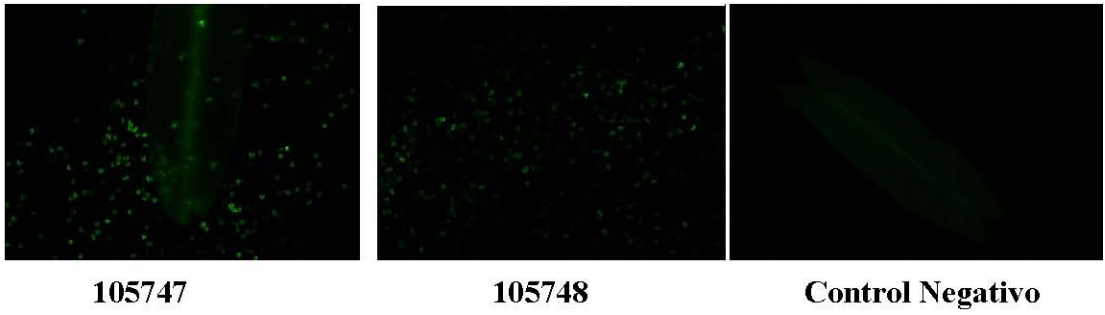


FIG. 32

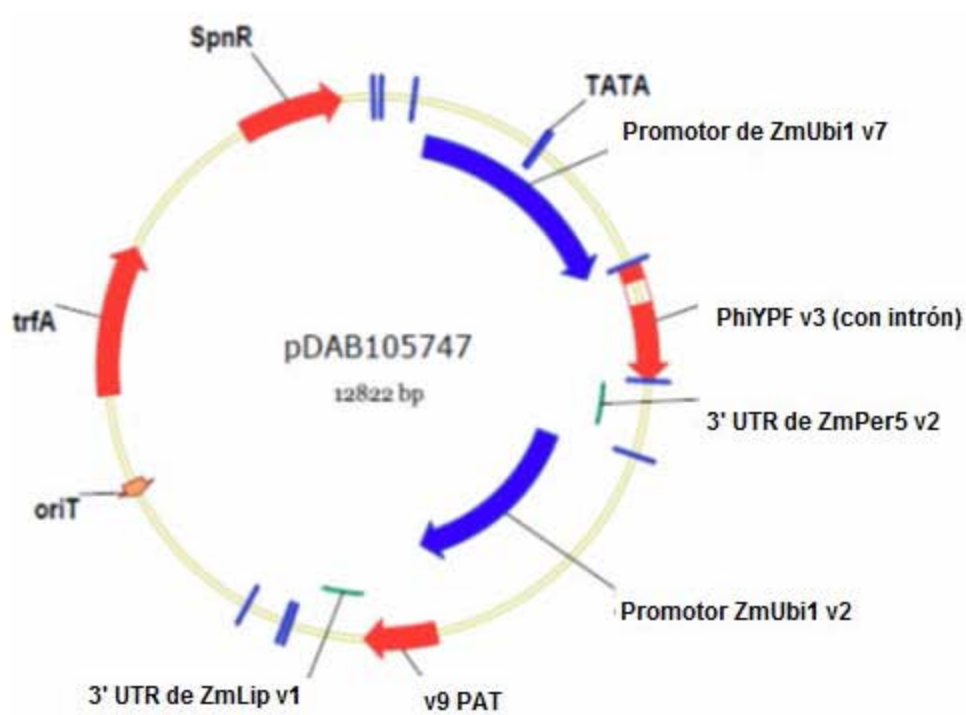


FIG. 10

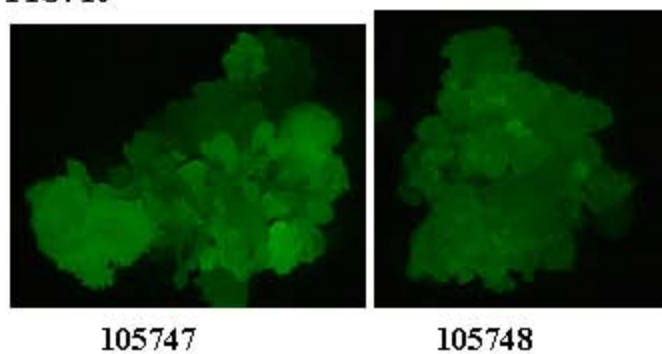


FIG. 11

FIG. 8

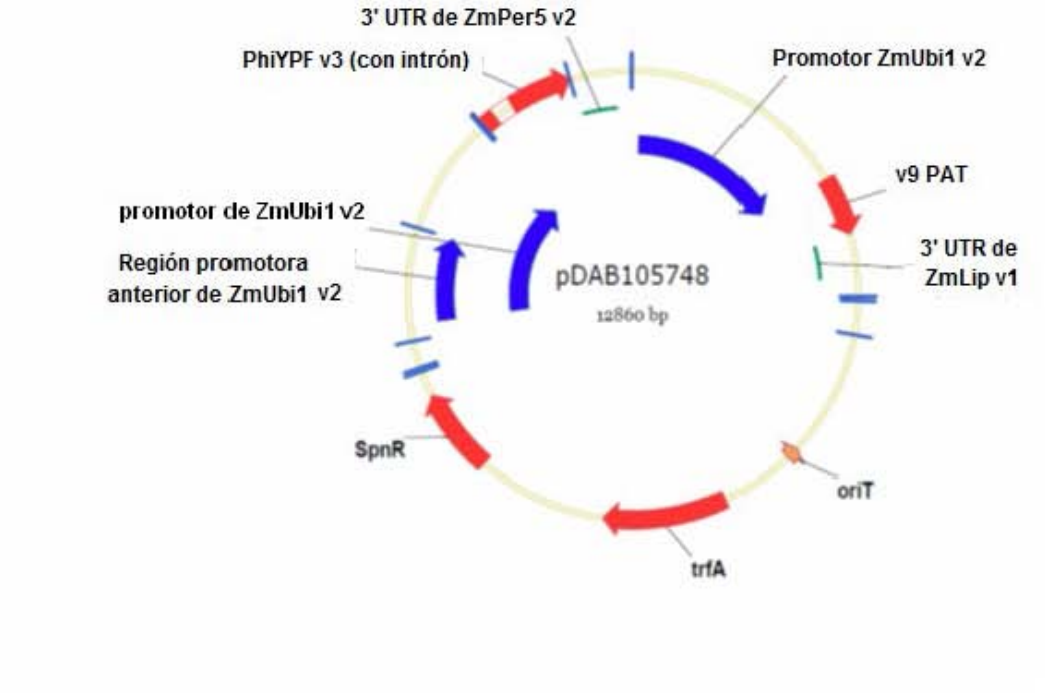


FIG. 9

Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(473)	TTCATAGTTACGAATTGAAGATGATGGATG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(481)	TTCATAGTTACGAATTGAAGATGATGGATG	
		511	540
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(503)	GAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(511)	GAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT	
		541	570
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(533)	TGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(541)	TGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGA	
		571	600
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(563)	GATGCTTTTTTGTTGCTTGGTTGTGATGAT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(571)	GATGCTTTTTTGTTGCTTGGTTGTGATGAT	
		601	630
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(593)	GTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTCAATTCGTT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(601)	GTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTCAATTCGTT	
		631	660
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(623)	CTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAAC	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(631)	CTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAAC	
		661	690
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(653)	ACCTGGTGTATTTATTAATTTTGGAAC	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(661)	ACCTGGTGTATTTATTAATTTTGGAAC	
		691	720
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(683)	ATGTGTGTGTCATACATCTTCATAGTTACG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(691)	ATGTGTGTGTCATACATCTTCATAGTTACG	
		721	750
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(713)	AGTTTAAGATGGATGGAAATATCGATCTAG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(721)	AGTTTAAGATGGATGGAAATATCGATCTAG	
		751	780
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(743)	GATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTAC	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(751)	GATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTAC	
		781	810
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(773)	TGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(781)	TGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCA	
		811	840
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(803)	TCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(811)	TCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCT	
		841	870
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(833)	ATCTATTATAATAAAACAAGTATGTTTTATA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(841)	ATCTATTATAATAAAACAAGTATGTTTTATA	
		871	900
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(863)	ATTATTTTGATCTTGATATACTTGATGAT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(871)	ATTATTTTCGATCTTGATATACTTGATGAT	
		901	930
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(893)	GGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(901)	GGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTT	
		931	960
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(923)	TTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(931)	TTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTG	
		961	990
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(953)	CTTGGTACTGTTTCTTTTGTCGATGCTCAC	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(961)	CTTGGTACTGTTTCTTTTGTCGATGCTCAC	
		991	1016
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(983)	CCTGTTGTTTGGTGTTACTTCTGCAG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(991)	CCTGTTGTTTGGTGTTACTTCTGCA-	

FIG. 7

		1	30
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(1)	GTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCC	---
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(1)	GTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCC	CCC
		31	60
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(28)	-TCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGTTCCGG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(31)	CTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGTTCCGG	
		61	90
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(57)	TCCATG----GTTAGGGCCCGGTAGTTCTA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(61)	TCCATGCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTA	
		91	120
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(83)	CTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(91)	CTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGT	
		121	150
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(113)	TTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(121)	TTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGT	
		151	180
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(143)	ACACGGATGCGACCTGTACGT CAGACACGT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(151)	ACACGGATGCGACCTGTACGT CAGACACGT	
		181	210
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(173)	TCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(181)	TCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTT	
		211	240
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(203)	TGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(211)	TGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTT	
		241	270
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(233)	CGCAGACGGGATCGATTT CATGATTTTTTT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(241)	CGCAGACGGGATCGATTT CATGATTTTTTT	
		271	300
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(263)	TGTTTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTTGCCCT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(271)	TGTTTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTTGCCCT	
		301	330
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(293)	TTTCCTTTATTTCAATATATGCCGTGCACT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(301)	TTTCCTTTATTTCAATATATGCCGTGCACT	
		331	360
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(323)	TGTTTGT CGGGT CATCTTTTCATGCTTTTT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(331)	TGTTTGT CGGGT CATCTTTTCATGCTTTTT	
		361	390
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(353)	TTTGTCTTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(361)	TTTGTCTTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGT	
		391	420
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(383)	TGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(391)	TGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATT	
		421	450
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(413)	CTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(421)	CTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAA	
		451	480
Zea mays c.v. LLN37 Intrón	(443)	TTTTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Intrón	(451)	TTTTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATA	
		481	510

FIG. 6

		1	30
Zea mays c.v. LLN37 Líder	(1)	TCCCCAACCTCGTGTTGTTCGGAGCGCACA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Líder	(1)	TCCCCAACCTCGTGTTGTTCGGAGCGCACA	
		31	60
Zea mays c.v. LLN37 Líder	(31)	CACACACAACCAGATCTCCCCAAATCCAC	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Líder	(31)	CACACACAACCAGATCTCCCCAAATCCAC	
		61	82
Zea mays c.v. LLN37 Líder	(61)	CCGTGGCACCTCCGCTTCAAG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Líder	(61)	CCGTGGCACCTCCGCTTCAAG	

Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(472)	<u>TAGAATAAAATAAAGTGA</u> <u>CTAAAAATTAAA</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(481)	<u>TAGAATAAAATAAAGTGA</u> <u>CTAAAAATTAAA</u>
		511 540
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(502)	<u>CAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAACTA</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(511)	<u>CAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAACTA</u>
		541 570
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(532)	<u>AGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATA</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(541)	<u>AGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATA</u>
		571 600
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(562)	<u>ATGCCAGCCTGTTAAACGCCGTCGACGAGT</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(571)	<u>ATGCCAGCCTGTTAAACGCCGTCGACGAGT</u>
		601 630
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(592)	<u>CTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGC</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(601)	<u>CTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGC</u>
		631 660
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(622)	<u>GTGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCA</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(631)	<u>GTGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCA</u>
		661 690
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(652)	<u>CGGCATCTCTGTGCTGCCTCTGGACCCCT</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(661)	<u>CGGCATCTCTGTGCTGCCTCTGGACCCCT</u>
		691 720
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(682)	<u>CTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTG</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(691)	<u>CTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTG</u>
		721 750
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(712)	<u>CTCCGCTGTGCGCATCCAGAAATTGCGTGG</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(721)	<u>CTCCGCTGTGCGCATCCAGAAATTGCGTGG</u>
		751 780
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(742)	<u>CGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAG</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(751)	<u>CGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAG</u>
		781 810
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(772)	<u>GCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGC</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(781)	<u>GCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGC</u>
		811 840
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(802)	<u>AGCTACGGGGGATTCTTTCCACCGCTCC</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(811)	<u>AGCTACGGGGGATTCTTTCCACCGCTCC</u>
		841 870
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(832)	<u>TTGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATA</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(841)	<u>TTGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATA</u>
		871 896
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(862)	<u>AATAGACACCCCTCCACACCCTCTT</u>
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(871)	<u>AATAGACACCCCTCCACACCCTCTT</u>

FIG. 5

		1	30
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(1)	-----GACCCGGTCGTGCCCCCTCTCT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(1)	GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCCCTCTCT	
		31	60
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(22)	AGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGTTA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(31)	AGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGTTA	
		61	90
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(52)	TAAAAAATTACCACATATTTTTTTTGT CAC	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(61)	TAAAAAATTACCACATATTTTTTTTGT CAC	
		91	120
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(82)	ACTTGTTTGAAGTGCAGTTTATCTATCTTT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(91)	ACTTGTTTGAAGTGCAGTTTATCTATCTTT	
		121	150
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(112)	ATACATATATTTAAACTTTACTCTACGAAT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(121)	ATACATATATTTAAACTTTACTCTACGAAT	
		151	180
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(142)	AATATAATCTATAGTACTACAATAATATCA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(151)	AATATAATCTATAGTACTACAATAATATCA	
		181	210
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(172)	GTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(181)	GTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGT	
		211	240
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(202)	TAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(211)	TAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATT	
		241	270
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(232)	TTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(241)	TTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTT	
		271	300
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(262)	TTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTTG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(271)	TTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTTG	
		301	330
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(292)	CAAATAGCTTCACCTATATAATACTTCATC	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(301)	CAAATAGCTTCACCTATATAATACTTCATC	
		331	360
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(322)	CATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(331)	CATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTA	
		361	390
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(352)	GGGTTAATGGTTTTTATAGACTAATTTTTT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(361)	GGGTTAATGGTTTTTATAGACTAATTTTTT	
		391	420
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(382)	TAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(391)	TAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCT	
		421	450
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(412)	CTAAATTAAGAAAACTAAACTCTATTTTA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(421)	CTAAATTAAGAAAACTAAACTCTATTTTA	
		451	480
Zea mays c.v. LLN37 Anterior	(442)	GTTTTTTTATTTAATAATTAGATATAAAA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 Anterior	(451)	GTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATATAAAA	
		481	510

FIG. 4

GACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGTTATA
AAAAATTACCACATATTTTTTTTGTCCACTTGTTTGAAGTGCAGTTTATCTAT
CTTTATACATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTA
CAATAATATCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTC
TAAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAG
TGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCTATATAATACTTCA
TCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTTTTTATAGACT
AATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATTAAGAAAAC
AAAACCTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAAATAGAATAAA
ATAAAGTGAATAAAAATTAACAAATACCCTTTAAGAAATTAACAAAACTAA
GGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAACGCCGTCG
ACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAA
GCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGA
GTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGG
CGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACG
GCACCGGCAGCTACGGGGGATTCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCC
TCGCCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTCCACACCCTCTTTCCCCAACCTCG
TGTTGTTTCGGAGCGCACACACACAACCAGATCTCCCCCAAATCCACCCGT
CGGCACCTCCGCTTCAAGgtacgcegtcgtcctccccccccctctaccttcttagatcggtccggt
ccatggtagggccggtagttctacttctgttcatgtttgtgttagatccgtgtttgtgttagatccgtgctgtagcggttcgtacag
gatgcgacctgtacgtcagacacgttctgattgetaacttgccagtgtttctcttggggaatcctgggatggctctagecggtccgc
agacgggatcgattcatgattttttgttcgttgcatagggttgggttgccttttcttattcaatatgcgtgcacttgttgc
gggtcatctttcatgctttttgtcttgggtgtgatgtgtgtggttggcggtcgttctagatcgagtagaattctgttcaaa
ctacctgggtggatttattatgttgatctgtatgtgtgtgccatacatattcatagttacgaattgaagatgatggatggaaatcgcg
ctaggataggtatacatgttgatgcgggtttactgatgcatacacagagatgcttttgtcgttgggtgtgatgtgtgtgtgtgt
ggcggtcgttcattcggtctagatcgagtagaatactgttcaactacctggtgtatttattatgttgaactgtatgtgtgtgca
tacatctcatagttacgagtttaagatggatggaaatcgcgctaggtataggtatacatgttgatgtgggtttactgatgcatac
atgatggcatatgcagcatctatcatatgctctaaccttgagtacctatctattataataaacaagtatgtttataattttgatctg
atatactggatgatggcatatgcagcagctatatgttgatttttagccctgccttcatacgctattttgttgggtactgttctttg
tcgatgtcacctgtgttgggtgttacttctgcag

FIG. 3

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTC
TAAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTGTGCACACTTGTTTGAAGTGCA
GTTTATCTATCTTTATACATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCT
ATAGTACTACAATAATATCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTA
GACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTT
ATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCTATA
TAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTT
TTTATAGACTAATTTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATT
AAGAAAACATAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATATAAAA
TAGAATAAAATAAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTAA
AAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAA
ACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGT
CGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCC
TCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAA
TTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTC
CTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCGCTT
TCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTCCACACCCTCTTTCCC
CAACCTCGTGTTGTTTCGGAGCGCACACACACAACCAGATCTCCCCCAAAT
CCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGgtacgecgctcgtcctccccccccccccctctacettct
agatcggegttcgggtccatgcattggttagggcccggtagttctacttctgttcattgtttgtgtagatccgtgtttgtgtagatccgt
gctgctagcgttcgtacacggatgcacgtgtacgtcagacacgttctgattgctaacttgecagtgttctcttggggaatcctgg
gatggctctagcgttcggcagacgggatcgatttcattgtttttgttcgttgcatagggttgggttgccttttctttatttcaat
atatgcctgtcacttgtttgtcgggtcatttttcattgtttttgtcttgggtgtgatgtggtctggttggcggtcgttctagatc
ggagtagaattctgtttcaactacctgggtggatttattattttggatctgtatgtgtgtgccatacatattcatagttacgaattgaag
atgatggatggaaatategatctaggataggtatacatgttgatgcgggttttactgatgcatacacagagatgcttttgttcgcttg
gttgtgatgatgtggtgtggttggcggtcgttcattcgttctagatcggagtagaatactgtttcaactacctgggtgtatttatttatt
ttggaactgtatgtgtgtgcatacatcttcattagttacgagtttaagatggatggaaatategatctaggataggtatacatgttgatg
tgggttttactgatgcatacatgatggcatatgcagcatctattcatatgctctaacttgagtacctatctattataataaacaagta
tgtttataattatttcgatttgatatacttggatgatggcatatgcagcagctatatgttgattttttagccctgccttcatacgtattt
atttgccttggtactgtttctttgtcgtatgctcaccctgttgttgggtgtacttctgca

FIG. 1

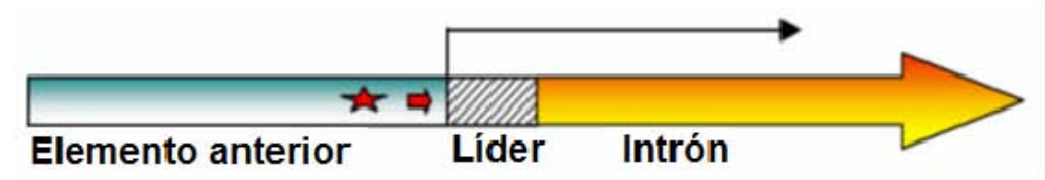


FIG. 2

