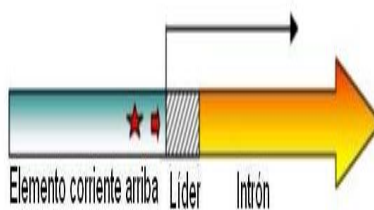


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

FIG. 1



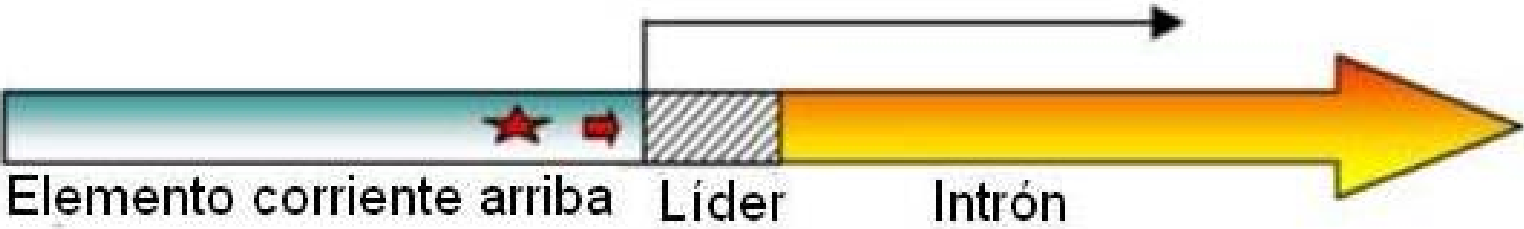
1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
NUEVOS PROMOTORES DE LA UBIQUITINA DE MAIZ			
2	Datos del Solicitante		
Nombre:		DOW AGROSCIENCES LLC	Dirección Electrónica: clientes@cavelier.com
Dirección:		9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América	Domicilio/País 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/US2014/072921	Fecha Solicitud:	31/12/2014
Número Publicacion:		WO 2015/103354 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 61/922,529	(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



NUEVOS PROMOTORES DE LA UBIQUITINA DE MAIZ

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio conforme al Título 35, artículo 119(e) del USC [Código de los Estados Unidos] de la solicitud provisional de número de serie 61/922,529, presentada el 31 de diciembre de 2013, cuya descripción completa se incorpora a la presente mediante esta referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, generalmente, al campo de la biología molecular vegetal y más específicamente, al campo de la expresión de transgenes en plantas.

ANTECEDENTES

Muchas especies de plantas son capaces de ser transformadas con transgenes para introducir atributos o características agrónomicamente deseables. Las especies de plantas se desarrollan y/o se modifican para tener atributos particulares deseables. Generalmente, los atributos deseables incluyen, por ejemplo, mejorar la calidad del valor nutricional, aumentar el rendimiento, conferir resistencia contra plagas o enfermedades, aumentar la tolerancia a la sequía y al estrés, mejorar las cualidades hortícolas (por ejemplo, pigmentación y crecimiento), impartir resistencia contra los herbicidas, permitir la producción de compuestos y/o materiales útiles en forma industrial a partir de la planta, y/o permitir la producción de productos farmacéuticos.

Las especies de plantas transgénicas que comprenden múltiples transgenes apilados en un único locus genómico se producen mediante tecnologías de transformación vegetal. Las tecnologías de transformación vegetal dar lugar a la introducción de un transgén en una célula vegetal, la recuperación de una planta transgénica que contiene la copia establemente integrada del transgén en el genoma de

la planta, y la posterior expresión transgénica mediante la transcripción y traducción del genoma de la planta da como resultado plantas transgénicas que poseen atributos y fenotipos deseables. Sin embargo, se prefieren los mecanismos que permiten la producción de especies de plantas transgénicas para expresar muy bien múltiples transgenes diseñados como una pila de atributos.

Asimismo, se prefieren los mecanismos que permiten la expresión de un transgén dentro de los tejidos u órganos particulares de una planta. Por ejemplo, se puede lograr el aumento de la resistencia de una planta contra la infección por patógenos del suelo al transformar el genoma de la planta con un gen resistente a los patógenos de modo que la proteína resistente al patógeno se exprese con fuerza dentro de las raíces de la planta. De manera alternativa, se puede preferir expresar un transgén en los tejidos vegetales que están en una fase de desarrollo o crecimiento particular tal como, por ejemplo, la división celular o la elongación.

En la presente memoria se describen elementos reguladores del promotor de la Ubi-1 de *Zea luxurians* que incluyen promotores, promotores corriente arriba, 5'-UTR e intrones. Se describen además construcciones y métodos que utilizan elementos reguladores génicos.

COMPENDIO

Se describen en la presente 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 comprende una secuencia de polinucleótidos. En una modalidad, una secuencia de polinucleótidos del promotor comprende un promotor corriente arriba, una región no traducida 5' (5'-UTR) o secuencia líder y un intrón. En una modalidad, una secuencia de polinucleótidos del promotor comprende el

gen de la ubiquitina-1 (Ubi-1). En una modalidad, una secuencia de polinucleótidos del promotor comprende el gen de la Ubi-1 de *Zea luxurians* (*Z. luxurians*).

En una modalidad, una construcción incluye un casete de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos del promotor que se obtuvo del gen de la Ubi-1 de *Z. luxurians*. En una modalidad, la secuencia de polinucleótidos del promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* comprende una región de promotores corriente arriba, 5' UTR o secuencia líder y un intrón. En una modalidad, una construcción incluye un casete de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos del promotor que se obtuvo del gen de la Ubi-1 de *Z. luxurians* fusionado con un intrón a partir del gen que codifica la Proteína Fluorescente Amarilla de la especie *Phialidium* (*PhiYFP*). En una modalidad, una construcción incluye un casete de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos del promotor que se obtuvo del gen de la Ubi-1 de *Z. luxurians* fusionado con un intrón a partir del gen que codifica la proteína amarilla fluorescente de la especie *Phialidium* (*PhiYFP*). (*ZmPer5*). La secuencia de polinucleótidos resultante comprende un elemento regulador del gen promotor nuevo.

En una modalidad, un casete de expresión génica incluye un elemento regulador del promotor genético unido en forma operativa a un transgén o a una secuencia de codificación heteróloga. En una modalidad, un casete de expresión génica incluye al menos, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más transgenes.

Se describen en la presente memoria los métodos de crecimiento de plantas que expresan un transgén que usa elementos reguladores del promotor génico (por ejemplo, un promotor corriente arriba, 5'-UTR e intrón). También se describen en la presente memoria los métodos para cultivar tejidos y células vegetales que expresan un transgén usando el elemento regulador del promotor génico. En una modalidad, los métodos que se describen en la presente incluyen expresión génica constitutiva en hojas, raíces, callos y polen de plantas. Además se describen en la presente memoria los métodos para purificar una

secuencia de polinucleótidos que comprende el elemento regulador del promotor génico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **FIG. 1** muestra un promotor novedoso esquemático que comprende el gen de la Ubi-1 del *Zea mays* c.v. El promotor se compone de un elemento anterior, una 5' UTR o secuencia líder y un intrón. El elemento anterior se ubica 5' anterior del sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés), que se indica con la flecha larga. El elemento anterior se compone de elementos reguladores, tales como una caja TATA, que se indica con la flecha corta, un elemento de choque térmico, que se indica con una estrella.

La **FIG. 2** muestra el mapa del plásmido para el vector pDAB105710 que comprende la secuencia promotora amplificado por PCR del gen de la Ubi-1 *Z. luxurians* v1.

La **FIG. 3** muestra la secuencia de polinucleótidos del promotor de control de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. SEQ ID NO: 1) la región del promotor corriente arriba subrayada, la 5'UTR/secuencia líder sombreada y la región de intrones en minúscula.

La **FIG. 4** muestra la secuencia de polinucleótidos del promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) la región del promotor corriente arriba subrayada, la 5'UTR/secuencia líder sombreada y la región de intrones en minúscula.

La **FIG. 5** muestra la alineación de la secuencia de polinucleótidos de las regiones del promotor corriente arriba de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 4) en comparación con la secuencia del promotor corriente arriba B73 *Z. mays* c.v. (SEQ ID NO: 3).

La **FIG. 6** muestra la alineación de la secuencia de polinucleótidos de las regiones líderes/5'-UTR de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 6) en comparación con la secuencia del promotor corriente arriba B73 *Z. mays* c.v. (SEQ ID NO: 5).

La **FIG. 7** muestra la alineación de la secuencia de polinucleótidos de las regiones de intrones de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 8) en comparación con la secuencia del promotor corriente arriba B73 *Z. mays* c.v. (SEQ ID NO: 7).

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

La **FIG. 9** muestra un mapa del vector de la construcción de expresión binaria, pDAB105743, que comprende el vector de entrada, pDAB105737 (*Z. luxurians* v1), insertado en el vector de destino, pDAB10197.

La **FIG. 10** muestra la expresión génica *PhiYFP* en los callos de plantas T₀ para las construcciones de expresión binaria pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73) y pDAB105743 (*Z. luxurians* v1).

La **FIG. 11** muestra la expresión génica *PhiYFP* en el polen de plantas T₀ para las construcciones de expresión binaria pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73), pDAB105743 (*Z. luxurians* v1) y un control negativo.

La **FIG. 12** muestra un mapa del vector de la construcción de expresión binaria, pDAB112853, que comprende el gen reportero *PhiYFP* y la 3'-UTR *ZmPer5* estimulados por un promotor v2 de la Ubi-1 *Zm*, y el gen *AAD-1* y la 3'-UTR *ZmLip* estimulada por un *Z. luxurians* v1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

Tal como se usa en la presente, los artículos "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto en forma clara e inequívoca indique lo contrario.

Tal como se usa en la presente, el término "retrocruzamiento" hace referencia a un proceso en el que un criador retrocruza la progenie híbrida con uno de los progenitores, por ejemplo, un híbrido F1 de la primera generación con uno de los genotipos parentales del híbrido F1.

Tal como se usa en la presente, el término "intrón" hace referencia a cualquier secuencia de ácido nucleico contenida en un gen (o secuencia expresada de nucleótidos de interés) que se transcribe pero no se traduce. Los intrones incluyen secuencias de ácido nucleico no traducidas dentro de una secuencia de ADN expresada, así como también una secuencia correspondiente en moléculas de ARN transcriptas a partir de estas.

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

Tal como se usa en la presente, los términos "región no traducida 5'" o "5'-UTR" hacen referencia a un segmento no traducido en el extremo 5' de las pre ARNm o ARNm maduras. Por ejemplo, en ARNm maduras, una 5'-UTR normalmente alberga en su extremo 5' un casquete de 7-metilguanosina y está involucrada en muchos procesos tales como, empalme, poliadenilación, exportación del ARNm hacia el citoplasma, identificación del extremo 5' del ARNm mediante maquinaria traduccional y la protección de los ARNm contra la degradación.

Tal como se usa en la presente, el término "región no traducida 3'" o "3'-UTR" hace referencia a un segmento no traducido en el extremo 3' de las pre ARNm o ARNm maduras. Por ejemplo, en ARNm maduras, esta región alberga la cola poli (A) y se sabe que cumple muchas funciones en la estabilidad, iniciación de la traducción del ARNm y la exportación del ARNm.

Tal como se usa en la presente, el término "señal de poliadenilación" hace referencia a una secuencia de ácido nucleico presente en las transcripciones de ARNm que permite las transcripciones cuando se encuentra en presencia de una polimerasa poli (A), para ser poliadenilada en el sitio de poliadenilación, por ejemplo, ubicado de 10 a 30 bases por debajo de la señal poli (A). Se conocen muchas señales de poliadenilación en la técnica que son útiles para la presente invención. Una secuencia de ejemplo incluye AAUAAA y variantes de estas, 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 (que incluye una proteína o ácido nucleico) que ha sido preparado a partir de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente es de origen natural (es decir, otro ADN cromosómico y extracromosómico).

Tal como se usa en la presente, el término "purificado" con respecto a moléculas de ácido nucleico no necesita de pureza absoluta (tal como la preparación homogénea). En cambio, "purificado" representa una indicación de que la secuencia es relativamente más pura que en su ambiente celular nativo. Por ejemplo, el nivel "purificado" de ácido nucleicos debe ser al menos de 2 a 5 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 clones de ADNc no son de origen natural, pero se obtienen preferentemente mediante la manipulación de una sustancia parcialmente purificada, de origen

natural (ARN mensajero). La construcción de la biblioteca de ADNc a partir del ARNm involucra la creación de una sustancia sintética (ADNc). Los clones de ADNc individuales se pueden purificar a partir de la biblioteca sintética mediante la selección clonal de las células que llevan la biblioteca de ADNc. Por lo tanto, el proceso que incluye la construcción de una biblioteca de ADNc a partir del ARNm y purificación de producciones de clones ADNc distintos en aproximadamente 10^6 veces de purificación del mensaje nativo. Asimismo, una secuencia de ADN promotora se puede clonar en un plásmido. Dicho clon no es de origen natural pero se obtiene preferentemente mediante la manipulación de una sustancia de origen natural, parcialmente purificada tal como una biblioteca de ADN genómico. Por lo tanto, la purificación de al menos una orden de magnitud, preferentemente dos o tres órdenes y más preferentemente cuatro o cinco órdenes de magnitud, se favorece en estas técnicas.

De manera similar, la purificación representa una indicación de que se ha producido un cambio químico o funcional en la secuencia de ADN del componente. Las proteínas y moléculas de ácido nucleico que han sido "purificadas" incluyen proteínas y moléculas de ácido nucleico purificadas mediante métodos de purificación estándar. El término "purificado" también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante métodos de ADN recombinante en una célula hospedadora (por ejemplo, células vegetales), así como también, moléculas de ácido nucleico, proteína y péptidos sintetizadas químicamente.

El término "recombinante" significa una célula u organismo en el que se produce la recombinación genética. También incluye una molécula (por ejemplo, un vector, plásmido, ácido nucleico, polipéptido o un ARN pequeño) que se ha modificado sintéticamente o en forma artificial (es decir, no naturalmente) a través de la intervención humana. La modificación se puede realizar en la molécula ya sea dentro o fuera de su ambiente o estado natural.

Tal como se usa en la presente, el término "expresión" hace referencia al proceso por medio de cual un polinucleótido se transcribe en el ARNm (lo que incluye pequeñas moléculas de ARN)

y/o el proceso por medio del cual el ARNm transcripto (también denominado "transcripción") se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. La expresión génica puede verse influenciada por señales externas, por ejemplo, la 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 lugar en el camino del ADN a ARN a proteína. La regulación de la expresión génica ocurre, por ejemplo, a través de controles que actúan en la transcripción, traducción, transporte del ARN y procesamiento, degradación de moléculas intermediarias, tales como ARNm o mediante la activación, inactivación, compartimentalización o degradación de moléculas de proteínas específicas luego que han sido realizadas o mediante combinaciones de estos. La expresión génica se puede medir a nivel del ARN o a nivel de la proteína mediante cualquier método conocido en la técnica, lo que incluye, de modo no taxativo, transferencia *Northern*, RT-PCR, transferencia Western, o ensayo/s de actividad de proteínas *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 como el silenciamiento génico postranscripcional. El silenciamiento de un locus diana mediante un locus de silenciamiento no unido puede ser el resultado de la inhibición de la transcripción (por ejemplo, silenciamiento génico transcripcional; TGS) o degradación de ARNm (por ejemplo, silenciamiento génico postranscripcional; PTGS), debido a la producción de ARN de cadena doble (ARNdc) correspondiente al promotor o secuencias transcriptas, respectivamente. La participación de distintos componentes celulares en cada proceso sugiere que el TGS y PTGS inducido por ARNdc probablemente es el resultado de la diversificación de un mecanismo común antiguo. Sin embargo, ha sido difícil una comparación estricta del TGS y PTGS dado que generalmente depende del análisis de distintos loci de silenciamiento. Un único locus de transgenes se puede describir para disparar tanto el TGS como el PTGS, debido a la producción de ARNdc correspondiente al promotor y secuencias transcriptas de diferentes genes diana.

Tal como se usa en la presente, los términos "molécula de ácido nucleico", "ácido nucleico" o "polinucleótido" (los tres términos se usan como sinónimos entre sí) hacen referencia a una forma polimérica de nucleótidos que puede incluir tanto cadenas antisentido como sentido de ARN, ADNc, ADN genómico y formas sintéticas, y polímeros mixtos de estos. Un "nucleótido" puede hacer referencia a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una molécula de ácido nucleico tiene comúnmente al menos 10 bases de longitud, a menos que se indique de otra manera. Los términos pueden hacer referencia a una molécula de ARN o ADN de longitud indeterminada. Los términos incluyen formas de cadena simple o doble de ADN. Una molécula de ácido nucleico puede incluir tanto nucleótidos de origen natural como modificados, unidos entre sí por enlaces de nucleótidos de origen natural o de origen no natural.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden modificar químicamente o bioquímicamente, o pueden contener bases de nucleótidos derivatizados o no naturales, como lo podrán apreciar fácilmente los expertos en el técnica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, sustitución de uno o más nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones de internucleótidos (por ejemplo, enlaces no cargados, tales como, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.; enlaces cargados, tales como, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.; restos pendientes, tales como, péptidos; intercaladores; tales como, acridina, psoraleno, etc.; quelantes; alquilantes y enlaces modificados, tales como, ácido nucleicos alfa anoméricos, etc.). El término "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier conformación topológica, lo que incluye, conformaciones de cadena simple, cadena doble, parcialmente doble, triple, de horquillas, circulares y con candado.

La transcripción prosigue en un manera de 5' a 3' a lo largo de la cadena de ADN. Esto significa que el ARN se realiza mediante la adición secuencial del ribonucleótido-5'-trifosfatos al extremo 3' de la cadena de crecimiento con una eliminación necesaria del pirofosfato. Tanto en la molécula de ácido nucleico circular como en

la lineal, los elementos discretos (por ejemplo, secuencias de nucleótidos particulares) pueden ser denominados "anteriores" en comparación con un elemento adicional si se unen o estuvieran unidos al mismo ácido nucleico en la dirección 5' a partir de ese elemento. De manera similar, se puede denominar a los elementos discretos como "posteriores" en comparación con un elemento adicional si se unen o estuvieran unidos al mismo ácido nucleico en la dirección 3' a partir de ese elemento.

Tal como se usa en la presente, el término "posición de base" hace referencia a una ubicación de un residuo de nucleótidos o base dada dentro de un ácido nucleico designado. Un ácido nucleico designado se puede definir por la alineación con un ácido nucleico de referencia.

Tal como se usa en la presente, el término "hibridación" hace referencia a un proceso en el que los oligonucleótidos y sus análogos hibridan mediante el enlace de hidrógeno, lo que incluye Watson-Crick, Hoogsteen, o el enlace de hidrógeno de Hoogsteen inverso entre las bases complementarias. Generalmente, las moléculas de ácido nucleico de bases de nitrógeno son o pirimidinas, tales como citocina (C), uracilo (U) y timina (T), o purinas, tales como adenina (A) y guanina (G). Las bases de nitrógeno forman enlaces de hidrógeno entre una piridimina y una purina, y el enlace de una pirimidina con una purina se denomina "apareamiento de bases". Más específicamente, A formará un enlace de hidrógeno específico con T o U y G se enlazará específicamente con C. "Complementario" hace referencia a un apareamiento de bases que ocurre entre dos secuencias de ácido nucleico distintas o dos regiones distintas de la misma secuencia de ácido nucleico.

Tal como se usa en la presente, los términos "específicamente hibridable" y "específicamente complementario" hacen referencia a un grado suficiente de complementariedad de modo que ocurra el enlace específico y estable entre un oligonucleótido y una ADN o ARN diana. Los oligonucleótidos no necesitan ser 100 % complementarios con respecto a la secuencia diana para hibridarse específicamente. Un oligonucleótido se hibrida específicamente cuando el enlace de los oligonucleótidos con la molécula de ADN o ARN diana interfiere con la

función normal del ADN o ARN diana y hay suficiente grado de complementariedad para evitar el enlace no específico de un oligonucleótido con secuencias no dianas en condiciones en las que se desea el enlace específico, por ejemplo, en condiciones fisiológicas en el caso de sistemas o ensayos *in vivo*. Dicho enlace se denomina hibridación específica. Las condiciones de hibridación dan como resultado grados particulares de rigurosidad variarán de acuerdo con la naturaleza del método de hibridación elegido y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico 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 la hibridación, aunque los períodos de lavado también influyen en la rigurosidad. Los cálculos sobre las condiciones la hibridación que se necesitan para obtener grados particulares de rigurosidad se tratan en Sambrook *et ál.* (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.a ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.

Tal como se usa en la presente, la frase "condiciones rigurosas" abarca las condiciones en las que ocurrirá la hibridación únicamente si hay menos de 50 % de discordancia entre la molécula de hibridación y el ADN objetivo. Las "condiciones rigurosas" incluyen niveles particulares adicionales de rigurosidad. Por lo tanto, tal como se usa en la presente, las condiciones de "rigurosidad moderada" son aquellas en las que las moléculas con más del 50 % de discordancia de secuencias no hibridarán; las condiciones de "rigurosidad media" son aquellas en las que las moléculas con más del 20 % de discordancia no hibridarán; y las condiciones de "rigurosidad alta" son aquellas en las que las secuencias con más del 10 % de discordancia no hibridarán.

En modalidades particulares, las condiciones rigurosas pueden incluir la hibridación a 65°C, seguida de lavados a 65 °C con 0,1x de SSC/0,1 % de SDS durante 40 minutos. Siguen a continuación las condiciones de hibridación no taxativas y representativas:

- Rigurosidad muy alta: La hibridación en 5x de amortiguador de SSC a 65°C durante 16 horas; lavar dos veces en 5x de amortiguador de SSC a temperatura ambiente durante 15 minutos cada una; y lavar dos veces en 0,5x de amortiguador de SSC a 65 °C durante 20 minutos cada una.
- Rigurosidad alta: La hibridación en 5-6x de amortiguador de SSC a 65-70 °C durante 16-20 horas; lavar dos veces en 2x de amortiguador de SSC a temperatura ambiente durante 5-20 minutos cada una; y lavar dos veces en 1x de amortiguador de SSC a 55-70°C durante 30 minutos cada una.
- Rigurosidad moderada: hibridación en 6x de amortiguador de SSC a temperatura ambiente a 55 °C durante 16-20 horas; lavar al menos dos veces en 2-3x amortiguador de SSC a temperatura ambiente a 55 °C durante 20-30 horas cada una.

En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridables permanecen unidas en condiciones de hibridación de rigurosidad muy alta. En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridables permanecen unidas en condiciones de hibridación de rigurosidad alta. En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridables permanecen unidas en condiciones de hibridación de 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 escisión de segmentos de ácido nucleico más largo o mediante la polimerización de precursores de nucleótidos individuales. Los sintetizadores automatizados permiten la síntesis de los oligonucleótidos hasta varios cientos de pares de base de longitud. Dado que los oligonucleótidos pueden unirse a una secuencia de nucleótidos complementarios, se pueden utilizar como sondas para detectar ADN o ARN. Los oligonucleótidos compuestos de ADN (oligo-desoxirribonucleótidos) se pueden utilizar en la reacción en cadena de la polimerasa, una técnica para amplificar las pequeñas secuencias de ADN. En la reacción en cadena de la polimerasa, normalmente un oligonucleótido se denomina "cebador", que permite a la polimerasa de ADN extender el oligonucleótido y replicar la cadena complementaria.

Tal como se usa en la presente, los términos "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" hacen referencia a un procedimiento o técnica en la que cantidades de ácido nucleico, ARN y/o ADN, se amplifican como se describe en la patente estadounidense N.º 4,683,195. Generalmente, la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá, necesita estar disponible de modo que se puedan diseñar los cebadores de oligonucleótidos. Los cebadores de la PCR serán idénticos o similares en secuencia a las cadenas opuestas de la plantilla de ácido nucleico que se amplificará. Los nucleótidos de extremo 5' de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR puede utilizarse para amplificar secuencias de ARN o secuencias de ADN específicas del ADN y ADNc genómico total transcritos a partir del ARN celular total, bacteriófago, o secuencias de plásmidos, etc. Véase generalmente Mullis *et ál.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263 (1987); Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989).

Tal como se usa en la presente, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis a lo largo de una cadena complementaria cuando están las condiciones adecuadas para la síntesis de un producto de extensión de cebadores. Las condiciones de síntesis incluyen la presencia de cuatro trifosfatos de desoxirribonucleótido diferentes (es decir, A,T,G y C) y al menos un agente o enzima que induzca la polimerización tal como la transcriptasa inversa o polimerasa de ADN. Normalmente, estos reactivos están presentes en un amortiguador adecuado que puede incluir constituyentes que son cofactores o que afectan las 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 la amplificación, pero se pueden utilizar secuencias de cadena doble.

Tal como se usa en la presente, el término "sonda" hace referencia a una secuencia de oligonucleótidos o polinucleótidos que se hibrida en una secuencia diana. En el procedimiento de ensayo de

TaqMan[®] o estilo de TaqMan[®], la sonda se hibrida en una parte de la diana situada entre el sitio de hibridación de los dos cebadores. Una sonda incluye aproximadamente ocho nucleótidos, aproximadamente diez nucleótidos, aproximadamente quince nucleótidos, aproximadamente veinte nucleótidos, aproximadamente treinta nucleótidos, aproximadamente cuarenta nucleótidos o aproximadamente cincuenta nucleótidos. En algunas modalidades, una sonda incluye de aproximadamente ocho a aproximadamente quince nucleótidos.

En el procedimiento de ensayo de transferencia *Southern*, la sonda se hibrida a un fragmento de ADN que se encuentra adjunto a una membrana. Una sonda incluye aproximadamente diez nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 250 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 1.000 nucleótidos, aproximadamente 2.500 nucleótidos o aproximadamente 5.000 nucleótidos. En algunas modalidades, una sonda incluye de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.500 nucleótidos.

Una sonda puede incluir adicionalmente un marcador detectable, tal como, un marcador radioactivo, un marcador biotinilado, un fluoróforo (por ejemplo, Texas-Red[®], isotiocianato de fluoresceína, etc.). El marcador detectable puede estar directamente unido en forma covalente a los oligonucleótidos de la sonda, de modo que el marcador se ubique en el extremo 5' o en el extremo 3' de la sonda. Una sonda que comprende un fluoróforo puede incluir también un tinte inactivador (por ejemplo, Black Hole Quencher[™], Iowa Black[™], etc.).

Tal como se usa en la presente, los términos "identidad de secuencia" o "identidad" pueden ser usados indistintamente y hacen referencia a residuos de ácido nucleico en dos secuencias que son las misma cuando se alinean para una correspondencia mayor con respecto a una ventana de comparación específica.

Tal como se usa en la presente, el término "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje de homología de secuencia" hace referencia a un valor determinado al comparar dos secuencias alineadas en forma óptima (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico

o secuencias de aminoácidos) con respecto a una ventana de comparación, donde la parte de una secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones, sustituciones, discordancias y/o eliminaciones (es decir, brechas) en comparación con una secuencia de referencia con el fin de obtener un alineamiento óptimo de dos secuencia. Se calcula un porcentaje determinando la cantidad de posiciones en las que ocurre un residuo de ácidos nucleicos o aminoácidos en ambas secuencias para producir la cantidad de posiciones coincidentes, dividiendo la cantidad de posiciones coincidentes entre la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Los métodos para alinear secuencias para realizar una comparación se conocen muy bien. También se conocen bien en la técnica varios programas informáticos o bioinformáticos y algoritmos de alineación, tales como ClustalW y Sequencher, 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. EUA.* 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.

The National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST™; Altschul *et ál.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10) se encuentra disponible a partir de muchas fuentes, lo que incluye el *National Center for Biotechnology Information* (Bethesda, MD) y en internet, para uso en la conexión con varios programas de análisis de secuencias. Se encuentra disponible una descripción sobre cómo determinar una identidad de secuencia usando este programa en internet en la sección "ayuda" para BLAST™. Para realizar comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, se puede utilizar la función "secuencias Blast 2" del programa BLAST™ (Blastn) usando los parámetros predeterminados. Las secuencias de ácido nucleico con mayor similitud a las secuencias de referencia mostrarán una identidad de secuencia creciente cuando se evalúen con este método.

Tal como se usa en la presente, el término "operativamente unido" hace referencia a un ácido nucleico ubicado en una relación funcional con otro ácido nucleico. Generalmente, "operativamente unido" puede significar que los ácidos nucleicos son contiguos. La unión se puede lograr mediante la ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adoptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se enlazan o anillan al ácido nucleico y se usan para unir el fragmento de polinucleótido contiguo. Sin embargo, los elementos no necesitan ser contiguos para estar operativamente unidos.

Tal como se usa en la presente, el término "promotor" hace referencia a una región de ADN que se ubica generalmente en la parte anterior a un gen (es decir, hacia el extremo 5' de un gen) y es necesario para iniciar y manejar la transcripción del gen. Un promotor puede permitir la activación o represión adecuada de un gen que controla. Un promotor puede contener secuencias específicas que se reconocen mediante factores de transcripción. Estos factores pueden unirse a una secuencia de ADN promotor que da lugar al reclutamiento de la polimerasa de ARN, una enzima que sintetiza el ARN a partir de la región de codificación del gen. El promotor generalmente se refiere a todos los elementos reguladores génicos ubicados en la parte anterior del gen, lo que incluye, 5'-UTR, intrones y secuencias líderes.

Tal como se usa en la presente, el término "promotor corriente arriba" hace referencia a una secuencia de polinucleótidos contiguos que es suficiente para dirigir la iniciación de la transcripción. Tal como se usa en la presente, un promotor corriente arriba abarca el sitio de iniciación de la transcripción con varios motivos de secuencias, que incluyen una caja TATA, secuencia iniciadora (Intr), elementos de reconocimiento (BRE) y otros motivos del promotor (Jennifer, E.F. et ál, (2002) *Genes & Dev.*, 16: 2583-2592). El promotor corriente arriba proporciona el sitio de acción para la polimerasa II del ARN, una enzima de múltiples subunidades con factores de la transcripción general o basal como, TFIIA, B, D, E, F y H. Estos factores se ensamblan en un complejo de pre-iniciación de

la transcripción (PIC) que cataliza la síntesis del ARN a partir de una plantilla de ADN.

La activación del promotor corriente arriba se lleva a cabo mediante la adición de elementos reguladores de la secuencia de ADN a los que se unen varias proteínas y posteriormente interactúan con el complejo de iniciación de la transcripción para activar la expresión génica. Estas secuencias de elementos reguladores de genes interactúan con factores específicos de unión al ADN. Estos motivos de secuencias son frecuentemente denominados elementos *cis*. Dichos elementos *cis*, a los que se unen los factores de la transcripción específicos del desarrollo o específicos del tejido, en forma individual o en combinación, pueden determinar el patrón de expresión espaciotemporal de un promotor al nivel transcripcional. Estos elementos *cis* varían mucho en el tipo de control que ejercen en genes operativamente unidos. Algunos elementos actúan para aumentar la transcripción de los genes operativamente unidos en respuesta a respuestas ambientales (por ejemplo, temperatura, humedad y laceración). Otros elementos *cis* pueden responder a señales de desarrollo (por ejemplo, germinación, maduración seminal y floración) o a información espacial (por ejemplo, especificidad del tejido). Véase, por ejemplo, Langridge et ál. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86:3219-23. Estos elementos *cis* se encuentran ubicados a una distancia variable del punto de comienzo de la transcripción. Algunos elementos *cis* (llamados elementos proximales) son adyacentes a una región central mínima de promotores, mientras que otros elementos se puede ubicar a varios kilobases anteriores 5' o posteriores 3' al promotor (potenciadores).

Tal como se usa en la presente, el término "transformación" abarca todas las técnicas en las que una molécula de ácido nucleico se puede introducir en una célula. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo: transfección con vectores virales; transformación con vectores plásmidos; electroporación; lipofección; microinyección (Mueller et ál. (1978) Cell 15:579-85); *Agrobacterium*-mediated transfer; direct DNA uptake; WHISKERS™-mediated transformation; y microprojectile bombardment. Estas técnicas se pueden utilizar para la transformación

estable y la transformación transitoria de una célula vegetal. "Transformación estable" hace referencia a la introducción de un fragmento de ácido nucleico en un genoma de un organismo huésped que da como resultado la herencia genéticamente estable. Una vez transformado en forma estable, el fragmento de ácido nucleico se integra en forma estable en el genoma del organismo huésped y cualquier generación posterior. Los organismos huésped que contienen fragmentos de ácido nucleico se denominan organismos "transgénicos". "Transformación transitoria" hace referencia a la introducción de un fragmento de ácido nucleico en el núcleo u organela que contiene el ADN de un organismo huésped, lo que da como resultado la expresión génica sin la herencia genéticamente estable.

Tal como se usa en la presente, el término "transduce" hace referencia a un proceso en el que un virus transfiere ácido nucleico a una célula.

Tal como se usa en la presente, el término "transgén" se refiere a una secuencia de ácido nucleico exógeno. En un ejemplo, un transgén es una secuencia génica (por ejemplo, un gen resistencia a los herbicidas), un gen que codifica un compuesto industrial o farmacéuticamente útil, o un gen que codifica un atributo 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 la expresión de una secuencia de ácido nucleico diana. Un transgén puede contener secuencia reguladoras operativamente unidas 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 de interés es un ácido nucleico endógeno, donde se prefieren copias genómicas adicionales del ácido nucleico, o un ácido nucleico que se encuentra en la orientación antisentido con respecto a la secuencia de un ácido nucleico diana en el organismo huésped.

Tal como se usa en la presente, el término "vector" hace referencia a una molécula de ácido nucleico tal como se introduce en una célula, produciendo así una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula

hospedadora, tal como un origen de replicación. Los ejemplos incluyen, pero de modo no taxativo, un plásmido, cósmido, bacteriófago, cromosoma artificial bacteriano (BAC, por sus siglas en inglés) o virus que lleva ADN exógeno a una célula. Un vector puede incluir además uno o más genes, moléculas antisentido, genes marcadores seleccionables y otros elementos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, provocando así que la célula exprese las moléculas de ácido nucleico y/o proteínas codificadas mediante un vector. Un vector puede incluir opcionalmente materiales para ayudar a lograr la entrada de la molécula de ácido nucleico en la célula (por ejemplo, un liposoma).

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

Tal como se usa en la presente, el término "secuencia de codificación heteróloga" se utiliza para indicar cualquier polinucleótido que codifica o que codifica en última instancia para, un péptido o proteína o su secuencias de aminoácidos

equivalente, por ejemplo, un enzima, que no se encuentra presente normalmente en el organismo huésped y se puede expresar en la célula hospedadora en condiciones adecuadas. Como tal, "las secuencias de codificación heterólogas" pueden incluir uno o más copias adicionales de las secuencias de codificación que no se encuentran normalmente presentes en la célula hospedadora, de modo que la célula expresa copias adicionales de una secuencia de codificación que no se encuentra presente comúnmente en las células. Las secuencias de codificación heterólogas pueden ser ARN o cualquier tipo de este (por ejemplo, ARNm), ADN o cualquier tipo de este (por ejemplo, ADNc) o un híbrido de ARN/ADN. Los ejemplos de secuencias de codificación incluyen, pero de modo no taxativo, unidades de transcripción de longitud completa que comprenden dichas características como la secuencia de codificación, intrones, regiones promotoras, 5'-UTR, 3'-UTR y regiones potenciadoras.

Las "secuencias de codificación heterólogas" también pueden incluir la parte de codificación del péptido o enzima (es decir, la secuencia de ADNc o ARNm), la parte de codificación de unidad transcripcional de longitud completa (es decir, el gen que comprende intrones y exones), secuencias "optimizadas por codones", secuencias truncadas u otras formas de secuencias alteradas que codifican para la enzima o codifican para su secuencia de aminoácidos equivalente, siempre que la secuencia de aminoácidos equivalente produzca una proteína funcional. Dichas secuencias de aminoácidos equivalentes pueden tener una eliminación de uno o más aminoácidos, siendo la eliminación de extremo N, extremo C o interna. Las formas truncadas se prevén mientras que tenga la capacidad catalítica que se indica en la presente.

Tal como se usa en la presente, el término "control" hace referencia a una muestra utilizada en un procedimiento analítico para fines comparativos. Un control puede ser "positivo" o "negativo". Por ejemplo, cuando el objetivo de un procedimiento analítico es detectar una transcripción expresada en forma diferencial o polipéptido en células o tejidos, generalmente es preferible incluir un control positivo, tal como una muestra de una planta conocida que muestra la expresión deseada y un control

negativo, tal como una muestra de una planta conocida que carece de la expresión deseada.

Tal como se usa en la presente, el término "planta" incluye plantas y partes de plantas, pero de modo no taxativo, células vegetales y tejidos vegetales, tales como hojas, callos, tallos, raíces, flores, polen y semillas. Una clase de plantas que se puede utilizar en la presente invención es, por lo general, tan amplia como la clase de plantas superiores o inferiores dispuestas a la mutagénesis lo que incluye angiospermas, gimnospermas, helechos y algas multicelulares. Por lo tanto, "planta" incluye plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los ejemplos de plantas dicotiledóneas incluyen tabaco, *Arabidopsis*, soja, tomate, papaya, colza, girasol, algodón alfalfa, papas, vid, guandú, *Brassica*, garbanzo, remolachas azucareras, semilla de colza, sandía, melón, pimienta, maní, calabaza, rábano, espinaca, calabacín, brócoli, repollo, zanahoria, coliflor, apio, repollo chino, pepino, berenjena y lechuga. Los ejemplos de plantas monocotiledóneas incluyen maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, cebada, centeno, sorgo, orquídea, bambú, banana, totora, lirio, avena, cebolla, mijo y triticale.

Tal como se usa en la presente, el término "material vegetal" hace referencia a las hojas, callos, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutas, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, cultivos celulares o de tejidos, o cualquier otra parte o producto de una planta. En una modalidad, el material vegetal incluye el cotiledón y la hoja. En una modalidad, el material vegetal incluye tejidos de raíces y otros tejidos ubicados bajo tierra.

Tal como se usa en la presente, el término "gen marcador seleccionable" hace referencia a un gen que se usa opcionalmente en la transformación vegetal para, por ejemplo, proteger las células vegetales del agente selectivo o proporcionar resistencia/tolerancia a un agente selectivo. Además, se entiende que el "gen marcador seleccionable" abarca a los genes reporteros. Solamente aquellas células o plantas que reciben un marcador seleccionable funcional son capaces de dividir o crecer en

condiciones que tiene un agente selectivo. Los ejemplos de agentes selectivos pueden incluir, por ejemplo, antibióticos, lo que incluye espectinomina, 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, paranomicina, gentamicina y G418, o el gen para la neomicina fosfotransferasa (hpt) que expresa una enzima que confiere resistencia a la higromicina. Otros genes marcadores seleccionables pueden incluir genes que codifican la resistencia a los herbicidas, lo que incluye *bar* o *pat* (resistencia contra el glufosinato de amonio o la fosfinotricina), acetolactato sintasa (ALS, resistencia contra los inhibidores tales como sulfonilureas (SU), imidazolinones (IMI), triazolopirimidinas (TP), pirimidinil oxibenzoatos (POB) y sulfonilamino carbonil triazolinonas que evitan la primera etapa en la síntesis del aminoácido de cadena ramificada, glifosato, 2,4-D y resistencia o sensibilidad a los metales. Los ejemplos de "genes reporteros" que se pueden utilizar como un gen marcador seleccionable incluyen la observación visual de las proteínas del gen reportero expresado, tales como las proteínas que codifican β -glucuronidasa (GUS), luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), DsRed, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), fosfatasa alcalina y similares. La frase "marcador positivo" hace referencia a plantas que se han transformado para incluir un gen marcador seleccionable.

Tal como se usa en la presente, el término "marcador detectable" hace referencia a una etiqueta capaz de detectar, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminescente, un compuesto quimioluminiscente, quelador de metales o enzima. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, de modo no taxativo, los siguientes: etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, lantánida fósforos), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, biotinilada y epítopos de polipéptido predeterminados reconocidos por un reportero secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para

anticuerpos secundarios, dominios de unión de metales, etiquetas de epítomos). En una modalidad, un marcador detectable se puede unir por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

Tal como se usa en la presente, el término "detectar" se utiliza en el sentido más amplio para incluir tanto mediciones cuantitativas como cualitativas de una molécula específica, por ejemplo, mediciones de un polipéptido específico.

A menos que se defina específicamente de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado según lo entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente descripción. Se pueden encontrar las definiciones de términos comunes en biología molecular en, por ejemplo: 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.

Los promotores como elementos reguladores de la expresión génica

Los promotores vegetales utilizados para la investigación básica o aplicaciones biotecnológicas son generalmente unidireccionales, dirigiendo la expresión constitutiva de un transgén que se ha fusionado hasta su extremo 3' (posterior). A veces es necesario expresar con fuerza transgenes dentro de plantas para la ingeniería metabólica y el apilado de atributos. Además, normalmente se necesitan múltiples promotores nuevos en las cultivos transgénicas para conducir la expresión de los múltiples genes. Se describe en la presente un promotor constitutivo que pueden dirigir la expresión de un transgén que se ha fusionado en su extremo 3'.

El desarrollo de productos transgénicos se ha vuelto sumamente complejo, requiere de transgenes que se expresan con mucha fuerza y de múltiples transgenes de apilado en un único locus. Tradicionalmente, cada transgén necesita un único promotor para la

expresión, donde se necesitan múltiples promotores para expresar diferentes transgenes dentro de la pila de un gen. Con un tamaño creciente de pilas de genes, frecuentemente, este método lleva al uso repetido del mismo promotor para obtener niveles similares de patrones de expresión de diferentes transgenes para la expresión de un único atributo poligénico.

Es sabido que las construcciones de múltiples genes estimuladas por el mismo promotor causan el silenciamiento génico que tiene como resultado productos menos eficaces en el área. El exceso de sitios de unión de factores de transcripción (TF) debido a la repetición de promotores puede provocar el agotamiento de TF endógenos que llevan a la inactivación transcripcional. El silenciamiento de transgenes es probablemente que afecte en 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 del locus intra génica lo que dar lugar a rearrreglos de polinucleótidos.

Además de los promotores constitutivos, específicos para tejidos o promotores específicos para órganos conducen la expresión génica en determinados tejidos, tales como en el núcleo, raíz, hoja, callo, polen o tapete de la planta. Los promotores específicos de fase de desarrollo y de tejidos conducen la expresión de genes, los cuales se expresan en tejidos particular o en períodos de tiempo particulares durante el desarrollo vegetal. Se necesitan promotores específicos para tejidos para determinadas aplicaciones en la industria de las plantas transgénicas y son preferibles mientras permitan la expresión específica de genes heterólogos en un tejido y/o una fase de desarrollo seleccionado, que indica la expresión del gen heterólogo en forma diferencial en varios órganos, tejidos y/o en distintos momentos pero no otros.

Por ejemplo, se puede lograr el aumento de la resistencia de una planta contra la infección por patógenos del suelo al transformar el genoma de la planta con un gen resistente al patógeno de modo que una proteína resistente al patógeno se exprese con fuerza dentro de la planta. De manera alternativa, se puede preferir

expresar un transgén en los tejidos vegetales que están en una fase de desarrollo o crecimiento particular tal como, por ejemplo, la división celular o la elongación. Otra aplicación es la conveniencia de usar promotores específicos para tejidos, tales como los promotores que confinarían la expresión de los transgenes que codifican un atributo agronómico en las partes de plantas en desarrollo (es decir, raíces, hojas, callos o polen).

Los promotores que se describen en el presente son herramientas alentadoras para realizar las construcciones de transgenes comerciales que contiene múltiples genes. Estos promotores también proporcionan estabilidad estructural en huéspedes bacterianos y estabilidad funcional en células vegetales, tales como la reducción del silenciamiento transgénico para permitir la expresión transgénica. Los promotores con intervalos de expresión variable también se pueden obtener mediante el uso de los métodos que se describen en la presente. En comparación con las construcciones de transgenes usando un único promotor muchas veces, las construcciones de promotores diversificados que se describen en la presente solicitud son más compatibles para los análisis moleculares posteriores de eventos transgénicos. El uso de los promotores diversificados que se describen en la presente también puede aliviar los rearreglos en los loci de múltiples genes transgénicos durante el direccionamiento con tecnología de dedos de cinc (SHUKLA *et ál.* 2009).

Zea mays* y promotores de la Ubiquitina-1 de *Zea luxurians

El promotor de la Ubi-1 de *Zea mays* ha sido una norma de la industria biotécnica, predominantemente utilizado para la expresión transgénica alta y estable en el maíz (CHRISTENSEN and QUAIL 1996; CHRISTENSEN *et ál.* 1992; TOKI *et ál.* 1992). Cada transgén normalmente necesita un promotor específico para la expresión suficiente. Normalmente, se necesitan múltiples promotores para expresar diferentes transgenes dentro de una pila de genes. Frecuentemente, este paradigma lleva al uso repetitivo del promotor de la Ubi-1 de *Z. mays* debido a sus altos niveles deseados de expresión de proteínas y patrón de expresión constitutivo.

Sin embargo, la introducción deliberada de secuencias repetitivas en un locus transgénico puede llevar también a efectos negativos no deseables en la expresión y estabilidad transgénica (Fladung and Kumar 2002; Kumar and Fladung 2000a; Kumar and Fladung 2000b; Kumar and Fladung 2001a; Kumar and Fladung 2001b; Kumar and Fladung 2002; Mette et ál. 1999; Mourrain et ál. 2007). El desafío de la expresión transgénica coordinada múltiple se puede abordar usando un enfoque de diversidad de promotores, donde se utilizan diferentes promotores para llevar diferentes transgenes con el mismo perfil de expresión (Peremarti et ál. 2010). La presente solicitud describe una secuencia de promotores de la Ubi-1 diversificados, obtenida mediante la identificación y purificación del promotor nuevo de diferentes especies de *Zea*.

La iniciación de la transcripción y modulación de la expresión génica en genes vegetales está dirigida por una variedad de elementos de secuencias de ADN arreglados en conjunto en una secuencia más grande llamada promotor. Normalmente, los promotores eucariotas consisten en un promotor central mínimo y secuencias reguladoras anteriores. El promotor central es un tramo mínimo de la secuencia de ADN contigua que es suficiente para dirigir una iniciación de la transcripción adecuada. Los promotores centrales en las plantas comprenden generalmente de regiones canónicas asociadas con la iniciación de transcripción, tales como cajas CAAT y TATA (secuencia de consenso TATAWAW). Generalmente, el elemento de caja TATA se ubica aproximadamente a 20 a 35 pares de base (bp) anterior al sitio de inicio de la transcripción (TSS). La activación del promotor central se logra mediante secuencias reguladoras anteriores a las que se unen varias proteínas y posteriormente interactúan con el complejo de iniciación de la transcripción para activar la expresión génica. Los elementos reguladores comprenden secuencias de ADN que determinan el patrón de expresión espacio temporal de un promotor.

Con respecto a la FIG. 1, el promotor del gen Ubi-1 de *Z. mays* proviene de la línea celular endogámica B73 de *Z. mays*. El promotor de la Ubi-1 de *Z. mays* se compone de aproximadamente 895 bp de

secuencia de ADN ubicada en el extremo anterior 5' de la TSS (es decir, el elemento anterior). Además, el promotor de la Ubi-1 de *Z. mays* se compone de aproximadamente 1093 bp de secuencia de ADN ubicada en el extremo posterior 3' de la TSS (véase la patente estadounidense número 5,510,474). Por lo tanto, el promotor de la Ubi-1 de *Z. mays* se compone de aproximadamente 2 kilos de pares de bases (kp) de la secuencia de ADN total.

El elemento anterior del promotor de la Ubi-1 de *Z. mays* se compone de una caja TATA ubicada aproximadamente 30 bp de extremo 5' de la TSS (Figuras 1 y 3). Además, el elemento anterior comprende dos elementos de consenso de choque térmico ubicados inmediatamente de extremo anterior 5' de la TSS. Una 5'-UTR o secuencia líder de 82 bp se ubica inmediatamente posterior al extremo 3' de la TSS y sigue por un intrón que se extiende de la base 83 a 1093 (Figuras 1 y 3).

Trabajos anteriores han descrito el aumento de la expresión génica de los genes y/o transgenes regulados por el promotor de la Ubi-1 de *Z. mays*. Por ejemplo, la fusión de la transcripción del gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) con el promotor de la Ubi-1 de *Z. mays* produjo niveles 10 veces mayores de actividad CAT en los protoplastos del maíz que la expresión estimulada por el promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CHRISTENSEN and QUAIL 1996; CHRISTENSEN *et ál.* 1992).

Además del control del promotor de la Ubi-1 de *Z. mays*, esta solicitud describe un nuevo promotor de la Ubi-1 de maíz. A diferencia del promotor de la Ubi-1 de control que proviene de B73 genotipo c.v. de *Z. mays*, el nuevo promotor de la Ubi-1 provino de una especie diferente de *Zea*, *Zea luxurians*. El promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* que se utiliza en la presente tenía el genotipo de la versión 1 (v1). Se proporcionan construcciones y métodos usando un promotor de la Ubi-1 de *Z. mays* o *Z. luxurians* que comprende una secuencia de polinucleótidos. En una modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos del gen de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. de la siguiente manera:

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGTTATA
 AAAAATTACCACATATTTTTTTTTGTCACTTGTGTTGAAGTGCAGTTTATCTATCTTTATAC
 ATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTGTTT
 TAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGACAAC
 AGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTTGCAAATAGCTT
 CACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTT
 TTTATAGACTAATTTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATTAAGAAAA
 CTAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATATAAAATAGAATAAAATAAAGT
 GACTAAAAATTAACAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGT
 TTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCG
 AACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCT
 GGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATT
 GCGTGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCTCACGGCAC
 CGGCAGCTACGGGGGATTCCCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAA
 TAAATAGACACCCCCTCCACACCCTCTTTCCCAACCTCGTGTTGTTGGAGCGCACACACA
 CACAACCAGATCTCCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGGTACGCCGCTCGTC
 CTCCCCCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGTTCCGGTCCATGCATGGTTAGG
 GCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGTTTGTGTTAGATCCGTGCT
 GCTAGCGTTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGACACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAG
 TGTTTCTCTTTGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTTTCATG
 ATTTTTTTTGTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTTGCCCTTTTCCTTTATTTCAATATATGCCG
 TGCATTGTTTGTGCGGTCATCTTTTCATGCTTTTTTTTTGTCTTGGTTGTGATGATGTGGTC
 TGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATT
 AATTTTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATATTCATAGTTACGAATTGAAGATGATGGATG
 GAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGA
 TGCTTTTTGTTGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTCAATTCGTTCTAG
 ATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGTATTTATTAATTTTGGAACTGTATGTGT
 GTGTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTA
 TACATGTTGATGTGGGTTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATA
 TGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTTATAATTATTTGATC
 TTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTTAGCCCTGCCTTC
 ATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTGCGATGCTCACCCGTGTTGTTTGGTGTT
 ACTTCTGCA (SEQ ID NO: 1).

En otra modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos del gen de la Ubi-1 v1 *Z. luxurians* de la siguiente manera:

GACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAGGTATCAAAAATTAC
 CACATATTTTTTTGGCACACTTATTTAAAGTGCAGTTTATCTATCTCTATACACATATTTAA
 ACTTCACTTTATAAATAATATAGTTTATAGTACTAACTAATATCAGTGTTTTAGATAATTA
 TATAAATGAACCGCTAGACATGGTCTAAAGTACAACCGAGTATTTGACAACAGGACTCTACA
 GTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCTCTGTTTTTTTTTTTCAAATAGCTTGACCTAT
 ATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTAGGGATTTCAGGGTTGATGGTTTCTATAG
 ACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTATTTTTAATTTTTAAATTAAGAAAACCTGAAACTC
 TATTTTAGTTACTACAAATTAACAAATACCCTTTAAGGAATTAAAAAAACTAAGGAAACAT
 TTTTCTTGTTTCGAGTAGATTATGACAGCCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACAC
 CAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTC
 GCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCAT
 CCAGAAAGTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCCGG
 CAGCTACGGGGGATTCCCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAA
 ATAGACACCCCTCCACACCCTCTTTCCCCAACCTCGTGTTTGTTCGGAGCGCACACACACA
 CAACCAGATCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGGTACGCCGCTCATCCT
 CCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCAATCCGGTCCATGGTTAGGGCCCGATAGTTC
 TACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGT
 ACATCAGACACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGGCGAATCCAGGGATGGC
 TCTAGCCGTTCCGCAGACGGGTTTCGATTTTCATGATTTTTTTTTGTTTCGTTGCACATAGGGTT
 TGGTTTGCCCTTTTCTTTATTTCTTATATGCTGTACACTCTTTGTCGGGTCATCTTGTCA
 TGCTTCTTTTAATCTTGTTGTGATGATGTGCTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGT
 AGAATACTGTTTCAAGCTACCTGGTGGATTTATTAATTTTGTATCTGTACGTGTGTGCCATA
 CATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACAT
 GTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTTTTCGCTTGTTGTGATGAT
 GCGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGGA
 TTTATTAATTCTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATCTTGATAGTTACGAGTTTAAGATGA
 TGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTGATGTGGGTTTTACTGATGCATATA
 CATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATA
 AACAAGTATGTTTTATAATTATTTTGACCTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGC
 TATATGTGGATTTTTTTAGCCTTGCCTTCATACGCTATTTATTTGTTTGGGGCTGTTTCTTT
 TTGTTGACGCTCACCTGTTGTTTGGTGTACTTCTGCAG (SEQ ID NO: 2)

Los promotores que se describen en la presente se caracterizan mediante la clonación y el análisis de homología de la secuencia de ADN posterior para identificar regiones específicas del promotor (es decir, el promotor corriente arriba, 5'-UTR y regiones de intrones). Se proporcionan construcciones y métodos que usan un promotor de la Ubi-1 de *Z. mays* o *Z. luxurians* que comprenden

secuencias de polinucleótidos de una región del promotor corriente arriba, 5-UTR o región líder y un intrón para expresar transgenes en las plantas. En una modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos promotora de corriente arriba del gen de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. de la siguiente manera:

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGTTATA
AAAAATTACCACATATTTTTTTTTGTCACTTGTGTTGAAGTGCAGTTTATCTATCTTTATAC
ATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTGTTT
TAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGACAAC
AGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTTGCAAATAGCTT
CACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTT
TTTATAGACTAATTTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATTAAGAAAA
CTAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATATAAAATAGAATAAAATAAAGT
GACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGT
TTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCG
AACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCT
GGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATT
GCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCAC
CGGCAGCTACGGGGGATTCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAA
TAAATAGACACCCCCTCCACACCCTCTT (SEQ ID NO: 3)

En otra modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos del promotor corriente arriba del gen de la Ubi-1 v1 *Z. luxurians* de la siguiente manera:

GACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAGGTATCAAAAATTAC
CACATATTTTTTTGGCACACTTATTTAAAGTGCAGTTTATCTATCTCTATACACATATTTAA
ACTTCACTTTATAAATAATATAGTTTATAGTACTAACTAATATCAGTGTTTTAGATAATTA
TATAAATGAACCGCTAGACATGGTCTAAAGTACAACCGAGTATTTGACAACAGGACTCTACA
GTTTTATCTTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCTGTTTTTTTTTTTCAAATAGCTTGACCTAT
ATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTAGGGATTGAGGGTTGATGGTTTCTATAG
ACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTATTTTTAATTTTTAAATTAAGAAAACTGAACTC
TATTTTAGTTACTACAAATTAACAAATACCCTTTAAGGAATTAAAAAACTAAGGAAACAT
TTTTCTTGTTTCGAGTAGATTATGACAGCCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACAC
CAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTC
GCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCAT
CCAGAAAGTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGG

CAGCTACGGGGGATTCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAA
 ATAGACACCCCCTCCACACCCTCTT (SEQ ID NO: 4)

Elementos reguladores génicos adicionales

También es posible regular la expresión de transgenes mediante una región de intrones y/o 5'-UTR ubicada en la parte posterior 3' de la secuencia promotora anterior. Un promotor que comprende una región del promotor corriente arriba unida operativamente a una 5'-UTR y/o intrón puede regular la expresión de transgenes. Si bien se necesita un promotor corriente arriba para conducir la transcripción, la presencia de una 5'-UTR y/o intrón puede aumentar los niveles de expresión lo que da lugar a la producción de más transcripciones de ARNm para la traducción y síntesis de proteínas. La adición de una 5'-UTR y/o intrón para una secuencia de polinucleótidos de promotores anteriores puede ayudar la expresión estable de un transgén.

Además, un promotor constitutivo que comprende una secuencia de polinucleótidos del promotor corriente arriba

puede ser seguido por una 5-UTR o región líder para ayudar en la expresión de transgenes en las

plantas. En una modalidad, un promotor comprende una 5'-UTR o secuencia de polinucleótidos

del gen de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. de la siguiente manera:

TCCCCAACCTCGTGTTGTTTCGGAGCGCACACACACAACCAAGATCTCCCCCAAATCCACCC
 GTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO: 5)

En otra modalidad, un promotor puede comprender una 5'-UTR o secuencia de polinucleótidos del gen de la Ubi-1 v1 *Z. luxurians* de la siguiente manera:

TCCCCAACCTCGTGTTTGTTCGGAGCGCACACACACAACCAAGATCTCCCCCAAATCCACC
 CGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO: 6)

Además, un promotor constitutivo que comprende una secuencia de polinucleótidos del promotor corriente arriba

seguida de una 5-UTR o región líder también puede estar seguidas de un intrón para ayudar en la

expresión de transgenes en las plantas. En una modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de

polinucleótidos intrónica del gen de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. de la siguiente manera:

GTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGTTCCGGTC
CATGCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGTTTGT
GTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGACACGTTCTGAT
TGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACG
GGATCGATTTTCATGATTTTTTTTTGTTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTTGCCTTTTCTTTAT
TTCAATATATGCCGTGCACTTGTTTGTGCGGGTCATCTTTTCATGCTTTTTTTTTGTCTTGGTT
GTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTCTGTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTTCAAACCTAC
CTGGTGGATTTATTAATTTTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATATTCATAGTTACGAATT
GAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGA
TGCATATACAGAGATGCTTTTTGTTGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTTGGGCGGTCTG
TTCATTCTGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGTATTTATTAATTTT
GGAACCTGTATGTGTGTGTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGGATGGAAATATCG
ATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGC
AGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTTA
TAATTATTTTCGATCTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTT
TTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTGATGCTCACCC
TGTTGTTTGGTGTACTTCTGCA (SEQ ID NO: 7)

En otra modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos intrónica del gen de la Ubi-1 v1 *Z. luxurians* de la siguiente manera:

GTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCAATCCGGTCCATGGT
TAGGGCCCGATAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTA
CACGGATGCGACCTGTACATCAGACACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGG
CGAATCCAGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGTTTCGATTTTCATGATTTTTTTTTGTTT
CGTTGCACATAGGGTTTGGTTTGCCTTTTCTTTATTTCTTATATGCTGTACACTCTTTG
TCGGGTCATCTTGTGATGCTTCTTTTAATCTTGGTTGTGATGATGTGCTCTGGTTGGGCGGT
CGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAGCTACCTGGTGGATTTATTAATTTTGTATCT
GTACGTGTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATC
TAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTTTTTC
GCTTGGTTGTGATGATGCGGTCTGGTTGGGCGGTCTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTT
CAAACCTACCTGGTGGATTTATTAATTCTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATCTTGATAGT
TACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTCGATGTGGGT
TTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTA

CCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTGACCTTGATATACTTGGATGA
 TGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTTAGCCTTGCCTTCATACGCTATTTATTTGT
 TTGGGGCTGTTTCTTTTTGTTGACGCTCACCTGTTGTTTGGTGTACTTCTGCAG (SEQ
 ID NO: 8)

Casetes de expresión de genes reporteros y transgenes

La expresión de transgenes se puede regular también mediante 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 de la Ubi-1. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor de la Ubi-1 de una planta. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1, donde el promotor es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % idéntico a la SEQ ID NO: 2. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor constitutivo, tal como un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1, que está operativamente unido a un gen reportero o un transgén. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor constitutivo que está operativamente unido a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN y un transgén marcador seleccionable o combinaciones de 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 reporteros. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor constitutivo puede conducir la expresión de dos o más transgenes o genes reporteros.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1, donde la secuencia del promotor

corriente arriba es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 4. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor constitutivo, tal como un promotor corriente arriba de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unido a un gen reportero o un transgén. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor corriente arriba constitutivo que está operativamente unido a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN y un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor corriente arriba constitutivo puede conducir la expresión de uno o más transgenes o genes reporteros. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor corriente arriba constitutivo puede conducir la expresión de dos o más transgenes o genes reporteros. En una modalidad adicional, el promotor corriente arriba puede comprender un intrón. En una modalidad el promotor corriente arriba puede comprender una secuencia de intrones que está operativamente unido a un gen reportero o transgén. En otra modalidad, el promotor corriente arriba puede comprender una 5'-UTR o secuencia líder. En una modalidad el promotor corriente arriba puede comprender una 5'-UTR o secuencia líder que está operativamente unida a un gen reportero o transgén. En aun otra modalidad, un promotor corriente arriba puede comprender una 5'-UTR o secuencia líder y una secuencia de intrones. En una modalidad el promotor corriente arriba puede comprender una 5'-UTR o secuencia líder y una secuencia de intrones que está operativamente unida a un gen reportero o transgén.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1, donde la 5'-UTR o secuencia líder es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 6. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR o líder de un gen de maíz que codifica una proteína de la ubiquitina 1 que está operativamente unida a un promotor, donde el promotor es una

promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 o un promotor que se origina de una planta (por ejemplo, promotor de la ubiquitina 1 de *Zea mays* o *Zea luxurians*), un virus (por ejemplo, promotor del virus del mosaico de la mandioca), o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR o secuencia líder de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unida a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN y un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1, donde la secuencia intrónica es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 8. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón de un gen del maíz que codifica una proteína de la ubiquitina 1 que está operativamente unida a un promotor, donde el promotor es un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 o un promotor que proviene de una planta (por ejemplo, promotor de la ubiquitina 1 de *Zea mays* o *Zea luxurians*), un virus (por ejemplo, promotor del virus del mosaico de la mandioca), o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un intrón del gen de maíz que codifica una proteína de la Ubiquitina que está operativamente unida a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN y un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, un vector puede comprender 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, un virus o un fragmento del

polinucleótido eliminado por nosotros en la transformación directa o gen de direccionamiento, tal como un ADN donante.

En una modalidad, una célula o planta comprende un casete de expresión génica tal como se describe en la presente. En una modalidad, una célula o planta comprende un vector que comprende un casete de expresión génica tal como se describe en la presente solicitud. 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 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 monocotiledónea transgénica puede ser, pero de modo no taxativo, maíz, trigo, arroz, sorgo, avena, centeno, bananas, caña de azúcar y mijo. Una modalidad de una planta dicotiledónea transgénica puede ser, pero de modo no taxativo, soja, algodón, girasol o colza. Una modalidad también incluye una semilla transgénica de una planta transgénica, tal como se describe en la presente.

Marcadores seleccionables

Varios marcadores seleccionables también descritos como genes reportadores, se pueden incorporar en un vector de expresión para permitir la identificación y selección de plantas transformadas ("transformantes"). Se encuentran disponibles muchos métodos para confirmar la expresión de marcadores seleccionables en plantas transformadas, lo que incluye, por ejemplo, el secuenciamiento de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transferencia Southern, transferencia de ARN, métodos inmunológicos para la detección de una proteína expresada a partir del vector, tal como, la proteína precipitada que media la resistencia a la fosfinotricina, o la observación visual de otras proteínas tales como los genes reporteros que codifican la β -Glucuronidasa (GUS), Luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), DsRed, β -galactosidasa, cloranfenicol

acetiltransferasa (CAT), fosfatasa alcalina y similares (Véase Sambrook, *et ál.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001, cuyo contenido se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad).

Los genes marcadores seleccionables se utilizan para la selección de células o tejidos transformados. Los genes marcadores seleccionables incluyen genes que codifican la resistencia a los antibióticos, tales como aquellos que codifican la neomicina fosfotransferasa II (NEO) y la higromicina fosfotransferasa (HPT) así como también genes que confieren resistencia a compuestos herbicidas. Los genes resistentes a los herbicidas generalmente codifican una proteína diana modificada insensible al herbicida o una enzima que degrada o desintoxica el herbicida en la planta antes de que pueda actuar. Por ejemplo, la resistencia al glifosato se ha obtenido por medio de genes que codifican enzimas diana mutantes, la 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS). Los genes y mutantes para la EPSPS son muy conocidos y se describen en detalle a continuación. La resistencia al glufosinato de amonio, bromoxinil y 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) se ha logrado usando genes bacterianos que codifican *pat* o *DSM-2*, una *nitrilasa*, un gen *aad-1* o *aad-12* que desintoxica los herbicidas correspondientes.

En una modalidad, los herbicidas pueden inhibir el punto de crecimiento o meristemo, lo que incluye imidazolinona o sulfonilurea y genes para la resistencia/tolerancia de la acetohidroxiácido sintasa (AHAS) y acetolactato sintasa (ALS). Los genes resistentes al glifosato incluyen 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) y genes *dgt-28* mediante la introducción de ácidos nucleicos recombinantes y/o varias formas de mutagénesis *in vivo* de genes EPSP nativos, genes *aroA* y genes glifosato acetil transferasa (GAT), respectivamente. Los genes de resistencia para otros compuestos fosfonos incluyen genes BAR de la especie *Streptomyces*, lo que incluye *Streptomyces hygroscopicus* y *Streptomyces viridichromogenes* y piridinoxil o ácidos propiónicos fenoxi y ciclohexones (genes que codifican al inhibidor ACCase). Los genes de ejemplo que confieren resistencia a los ciclohexanedionas y/o ácido ariloxifenoxipropanoico (lo que incluye

aloxifop, Diclofop, Fenoxypop, Fluazifop, Quizalofop) incluyen genes de acetil coenzima A carboxilasa (ACCase) --Acc1-S1, Acc1-S2 y Acc1-S3. En una modalidad, los herbicidas pueden inhibir la fotosíntesis, lo que incluye la triazina (genes psbA y 1s+) y benzonitrilo (gen nitrilasa).

En una modalidad, los genes marcadores seleccionables incluyen, pero de modo no taxativo, genes que codifican: neomicina fosfotransferasa II; cianamida hidratasa; aspartato cinasa; dihidropicolinato sintasa; triptofán decarboxilasa; dihidropicolinato sintasa y aspartato cinasa desensibilizada; gen bar; triptofán decarboxilasa; neomicina fosfotransferasa (NEO); higromicina fosfotransferasa (HPT o HYG); dihidrofolato reductasa (DHFR); fosfinotricin acetiltransferasa; ácido 2-2-dicloropropiónico dehalogenasa; acetohidroxiácido sintasa; 5-enolpiruvil--shiquimato-3-fosfato sintetasa (aroA); haloarilnitrilase; acetil-coenzima A carboxilasa; dihidropteroato sintasa (sul I); y fotosistema II polipéptido de 32 kd (psbA).

Una modalidad también incluye genes que codifican resistencia a: cloramfenicol; metotrexato; higromicina; espectinomicina; bromoxinil; glifosato y fosfinotricina.

La lista precedente de genes marcadores seleccionables no es limitante. Cualquier gen marcador seleccionable o reportero está incluido en la presente invención.

Los genes marcadores seleccionable se sintetizan para la expresión óptima en la planta. Por ejemplo, en una modalidad, una secuencia de codificación de un gen se ha modificado mediante la optimización de codones para mejorar la expresión en las plantas. Un marcador seleccionable se puede optimizar para la expresión en una especie vegetal particular o alternativamente se puede modificar para la expresión óptima en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los codones preferidos de plantas se pueden determinar a partir de los codones de mayor frecuencia en las proteínas expresadas en la cantidad más grande en las especies vegetales de interés particulares. En una modalidad, un marcador seleccionable se diseña para expresarse en plantas a un nivel mayor lo que da como

resultado una mayor eficacia de transformación. Los métodos para la optimización de genes se conocen muy bien. Se pueden encontrar instrucciones sobre la optimización y elaboración de secuencias de polinucleótidos sintéticos en, por ejemplo, W02013/016546, W02011/146524, W01997/013402, patente estadounidense N.º 6,166,302, y patente estadounidense N.º 5,380,831, las que se incorporan a la presente memoria mediante esta referencia.

Transgenes

Los métodos y composiciones descritas se pueden utilizar para expresar secuencias génicas de polinucleótidos dentro del genoma vegetal. Por consiguiente, los genes que codifican la tolerancia a los herbicidas, la resistencia a los insectos, los nutrientes, los antibióticos o las moléculas terapéuticas se pueden expresar mediante el nuevo promotor.

En una modalidad el elemento regulador del promotor constitutivo de la descripción en cuestión, se combina o se une operativamente con uno o más genes que codifican secuencias de polinucleótidos que proporcionan resistencia o tolerancia al glifosato, glufosinato 2, 4-D u otro herbicida, proporciona resistencia a insectos selectos o enfermedades y/o mejoras nutricionales, aumenta las características agronómicas, proteínas u otros productos útiles en la nutrición, alimentos u otros usos farmacéuticos, industriales. Los transgenes se pueden "apilar" con dos o más secuencias de ácido nucleico de interés dentro de un genoma vegetal. El apilado se puede lograr, por ejemplo, mediante el cultivo vegetal convencional, usando dos o más eventos, transformación de una planta con una construcción que contiene las secuencias de interés, la retransformación de una planta transgénica o adición de nuevos atributos mediante la integración dirigida mediante la recombinación homóloga.

Dichas secuencias de polinucleótidos de interés incluyen, de modo no taxativo, aquellos ejemplos descritos a continuación:

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

(A) Genes resistentes a enfermedades vegetales. Las defensas vegetales se activan frecuentemente por medio de la interacción específica de un gen resistente a enfermedades (R) en la planta y el producto de un gen de avirulencia (Avr) correspondiente en el patógeno. Una variedad vegetal se puede transformar con un gen de resistencia clonado para plantas modificadas que son resistentes a las cepas de patógenos específicos. Ejemplos de dichos genes incluyen, el gen Cf-9 del tomate para la resistencia para *Cladosporium fulvum* (Jones et ál., 1994 Science 266:789), gen Pto del tomate, que codifica un proteína cinasa, para la resistencia de *Pseudomonas syringae* pv. tomate (Martin et ál., 1993 Science 262:1432) y el gen Arabidopsis RSSP2 para la resistencia a la *Pseudomonas syringae* (Mindrinos et ál., 1994 Cell 78:1089).

(B) una proteína *Bacillus thuringiensis*, un derivado de esta o un polipéptido sintético modelado de este, tal como, una secuencia de nucleótidos de un gen Bt d-endotoxina (Geiser et ál., 1986 Gene 48:109) y un gen insecticida vegetativo (VIP) (véase, por ejemplo, Estruch et ál. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:5389-94). Además, las molécula de ADN que codifican los genes d-endotoxina se pueden comprar de *American Type Culture Collection* (Rockville, Md.), con los número de acceso ATCC 40098, 67136, 31995 y 31998.

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

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

(E) Un inhibidor de enzimas, por ejemplo, un inhibidor de la proteasa o un inhibidor de la amilasa. Los ejemplos de dichos genes incluyen un inhibidor de la proteinasa cisteína de arroz (Abe et ál., 1987 J. Biol. Chem. 262:16793), un inhibidor I de la

proteínasa de tabaco (Huub et ál., 1993 Plant Molec. Biol. 21:985), y un inhibidor de la α -amilasa (Sumitani et ál., 1993 Biosci. Biotech. Biochem. 57:1243).

(F) Una hormona o feromona específica para insectos tal como un ecdisteroide y hormona juvenil, y una variante de esta, un mimético en base a este o un antagonista o agonista de este, tal como la expresión del baculovirus de la esterasa de la hormona juvenil clonada, un activador de hormona juvenil (Hammock et ál., 1990 Nature 344:458).

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

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

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

(J) Una enzima involucrada en la modificación, lo que incluye 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, un hidrolasa, un fosfatasa, un cinasa, una fosforilasa, un polimerasa, un elastasa, una quitinasa o una glucanasa, ya sean naturales o sintéticas. Los ejemplos de dichos genes incluyen, un gen callas (solicitud PCT publicada W093/02197), secuencias que codifican la quitinasa (que se pueden obtener, por ejemplo, de los números de acceso de ATCC 3999637 y 67152) quitinasa del

anquilostoma del tabaco (Kramer et ál., 1993 Insect Molec. Biol. 23:691), y gen de la 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 dichas moléculas incluyen secuencias de nucleótidos para los clones de ADNc de la calmodulina del frijol (Botella et ál., 1994 Plant Molec. Biol. 24:757) y una secuencia de nucleótidos de un clone de ADNc de la 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; el último enseña los péptidos antimicrobiales sintéticos que confieren resistencia a las enfermedades.

(M) Una membrana permeasa, un canal anterior o canal bloqueador, tal como un análogo de péptido lítico cecropin- β (Jaynes et ál., 1993 Plant Sci. 89:43) que vuelve a las plantas transgénicas del tabaco resistentes a las pseudomonas solanacearum.

(N) Una proteína invasiva, viral o una toxina compleja derivada de esta. Por ejemplo, la acumulación de proteínas de recubrimiento en células vegetales transformadas otorga resistencia a la infección viral y/o desarrollo de enfermedades efectuadas mediante el virus del cual proviene la proteína de recubrimiento, así como también mediante virus relacionados. Se ha conferido la resistencia mediada por proteínas de recubrimiento tras plantas transformadas contra el virus del mosaico de la alfalfa, virus del mosaico del pepino, virus de las estrías del tabaco, virus X de la papa, virus Y de la papa, virus del grabado del tabaco, virus del cascabeleo del tabaco y virus del mosaico del tabaco. Véase, por ejemplo, Beachy et ál. (1990) Ann. Rev. Phytopathol. 28:451.

(O) Un anticuerpo específico para insectos o una inmunotoxina derivada de este. Por lo tanto, un anticuerpo dirigido a una función metabólica crítica en los intestino del insecto inactivarían una enzima afectada, matando al insecto. Por ejemplo,

Taylor et ál. (1994) Abstract #497, séptimo simposio internacional sobre las interacciones moleculares de la planta y microbio muestra la inactivación enzimática en el tabaco transgénico mediante la producción de fragmentos de anticuerpos de cadena simple.

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

(Q) Una proteína de desarrollo llamativo producida en la naturaleza mediante un patógeno o un parásito. Por lo tanto, las poligalacturonasas endo α -1,4-D fúngicas facilitan la colonización fúngica y la liberación de nutrientes vegetales solubilizando la homo- α -1,4-D-galacturonasa de la pared de la célula vegetal (Lamb et ál., 1992) Bio/Technology 10:1436. La clonación y caracterización de un gen que codifica una proteína inhibidora de la endopoligalacturonasa en el frijol se describe en Toubart et ál. (1992 Plant J. 2:367).

(R) Una proteína de desarrollo llamativo producida en la naturaleza por una planta, tal como el gen que inactiva el ribosoma de la cebada que proporciona un aumento de la resistencia a enfermedades fúngicas (Longemann et ál., 1992). Bio/Technology 10:3305.

(S) Interferencia de ARN, en la que una molécula de ARN se usa para inhibir la expresión de un gen diana. Un ejemplo es una molécula de ARN que tiene cadena doble parcial o completa, lo que desencadena una respuesta de silenciamiento, lo que da como resultado la escisión del ARNs en ARN interferente pequeños, los que luego se incorporan a un complejo de direccionamiento que destruye los ARNm homólogos. Véase, por ejemplo, Fire et ál., patente estadounidense N.º 6,506,559; Graham et ál, patente estadounidense N.º 6,573,099.

2. Genes que confieren resistencia a un herbicida

(A) Genes que codifican resistencia o tolerancia a un herbicida que inhibe el punto de crecimiento o meristemo, tal como un herbicida

imidazalinona, sulfonanilida o sulfonilurea. Los genes de ejemplo en este código de categoría para la acetolactato sintasa mutante (ALS) Lee et ál., 1988 EMBOL. 7:1241) también conocida como enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) (Miki et ál., 1990 Theor. Appl. Genet. 80:449).

(B) Uno o más genes adicionales que codifican la resistencia o tolerancia al glifosato impartidos por la sintasa EPSP y genes *aroA* o a través de la inactivación metabólico por medio de genes tal como DGT-28, 2mEPSPS, GAT (glifosato acetiltransferasa) o GOX (glifosato oxidasa) u otros compuestos fosfonos tal como glufosinato (genes *pat*, *bar* y *dsm-2*) y ácidos ariloxifenoxipropiónicos y ciclohexanodionas (genes que codifican el inhibidor ACCase). Véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 4,940,835, que divulga 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 ATCC 39256, y la secuencia de nucleótidos del 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 los genes de glutamina sintetasa que confiere resistencia a los herbicidas tal como la L-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 codifican la actividad fosfinotricina acetil transferasa. Los genes de ejemplos que confieren resistencia a los ácidos ariloxifenoxipropiónicos y ciclohexanedionas, tales como setoxidim y haloxifop, son los genes *Accl-S1*, *Accl-S2* y *Accl-S3* descrito en 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 (genes *psbA* y *gs+*) y un benzonitrilo (gen nitrilasa). Przibilla et ál. 1991) Plant Cell 3:169 describe el uso de plásmidos que codifican genes *psbA* mutantes para transformar las *Chlamydomonas*. Las secuencias de

nucleótidos para los genes nitrilasa se describen en la patente estadounidense N.º 4,810,648 y moléculas de ADN que contienen estos genes están disponibles en los números de acceso ATCC 53435, 67441 y 67442. La clonación y expresión de ADN que codifica un glutatión S-transferasa se describe en Hayes et ál. (1992) Biochem. J. 285:173.

(D) Genes que codifican la resistencia o la tolerancia a un herbicida que se une a las hidroxifenilpiruvato dioxigenasas (HPPD), enzimas que catalizan la reacción en la que la para-hidroxifenilpiruvato (HPP) se transforma en homogentisato. Esto incluye herbicidas tales como EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, patente estadounidense N.º 5,424,276), en particular isoxaflutol, que es un herbicida selectivo para el maíz, dicetonitrilos (EP496630, EP496631), en particular 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃ fenil)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 produce un sobreabundancia de HPPD en las plantas que proporcionan tolerancia o resistencia a dicho herbicidas, lo que incluye, por ejemplo, los genes que se describen en las patentes estadounidenses N.º 6,268,549 y 6,245,968 y la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º 2003/0066102.

(E) Los genes que codifican la resistencia o tolerancia a los herbicidas fenoxi auxin, tales como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y que puede también conferir resistencia o tolerancia a los herbicidas ariloxifenoxipropionato (AOPP). Los ejemplos de dichos genes incluyen el gen de la enzima dioxigenasa dependiente de cetoglutarato, se describen en la patente estadounidense N.º 7,838,733.

(E) Los genes que codifican la resistencia o tolerancia a los herbicidas fenoxi auxin, tales como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y que puede también conferir resistencia o tolerancia a los herbicidas piridiloxi auxin, tales como fluroxipir o triclopir. Los ejemplos de dichos genes incluyen

el gen de la enzima dioxigenasa dependiente de la α -cetoglutarato, se describen en W02007/053482 A2.

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

(H) Genes que proporcionan resistencia o tolerancia a los herbicidas para inhibir la protoporfirinogen oxidasa (PPO) (Véase la patente estadounidense N.º 5,767,373).

(I) Genes que proporcionan resistencia o tolerancia a los herbicidas triazina (tales como la atrazina) y derivados urea (tal como diurón) herbicidas que se unen a proteínas centrales de los centros de reacción de fotosistema II (PS II) (Véase Brussian et ál., (1989) EMBO J. 1989, 8(4): 1237-1245.

3. Genes que confieren o contribuyen con un atributo de valor agregado

(A) El metabolismo de ácido graso modificado, por ejemplo, transformando el maíz o Brassica con un gen antisentido o esteroil-ACP desaturasa para aumentar contenido de ácido esteárico de la planta (Knultzon et ál., 1992) Proc. Nat. Acad. Sci. EUA 89:2624.

(B) Contenido de fitasa disminuido

(1) Introducción de un gen que codifica la fitasa, tal como el gen de fitasa *Aspergillus niger* (Van Hartingsveldt et ál., 1993 Gene 127:87), mejora el desglose de la fitasa, agregando más fosfato libre a la planta transformada.

(2) Se puede introducir un gen que reduce el contenido de fitato. En el maíz, esto, por ejemplo, se puede lograr al clonar y luego reintroducir el ADN asociado con el único alelo que es responsable de los mutantes del maíz caracterizados por los bajos niveles del ácido fítico Raboy et ál., 1990 Maydica 35:383).

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

Transformación

Los métodos adecuados para la transformación de plantas incluyen cualquier método donde el ADN se puede introducir en una célula, por ejemplo, de modo no taxativo: electroporación (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5,384,253); bombardeo de micro proyectiles (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 5,015,580; 5,550,318; 5,538,880; 6,160,208; 6,399,861; y 6,403,865); la transformación mediada por *Agrobacterium* (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 5,635,055; 5,824,877; 5,591,616; 5,981,840; y 6,384,301); y la transformación de protoplasmas (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5,508,184). Estos métodos se pueden utilizar para transformar establemente o transitoriamente una planta.

Se puede introducir una construcción de ADN directamente en el ADN genómico de la célula vegetal usando técnicas tales como la agitación con fibras de carburo de silicio (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 5,302,523 y 5,464,765). Las construcciones de ADN se pueden introducir directamente en el tejido vegetal usando métodos biolísticos, tales como el bombardeo de partículas de ADN (Véase, por ejemplo, Klein et ál., (1987) Nature 327:70-73). En forma alternativa, las construcciones de ADN se pueden introducir en la célula vegetal mediante la

transformación de nanopartículas (véase, por ejemplo, la publicación de la patente estadounidense N.º 2009/0104700, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad).

Además, la transferencia génica se puede lograr usando una bacteria o virus non-*Agrobacterium*, tal como *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, virus X de la papa, virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico de la mandioca y/o virus del mosaico del tabaco, véase, por ejemplo, Chung et ál. (2006) *Trends Plant Sci.* 11(1):1-4.

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

Luego de efectuar la entrega de un ácido nucleico exógeno a una célula receptora, se identifica generalmente un célula transformada para el cultivo y regeneración vegetal adicional. Con el fin de mejorar la capacidad de identificar transformantes, uno puede desear emplear un gen marcador seleccionable con el vector de transformación utilizado para generar el transformante. En una modalidad ilustrativa, se puede analizar una población de células transformadas exponiendo las células a un agente o agentes selectivos o las células se pueden analizar para determinar el atributo de gen marcador deseado.

Las células que sobrevivan la exposición a un agente selectivo o células que han obtenido un puntaje positivo en un ensayo de análisis pueden ser cultivadas en un medio que apoye la regeneración de las plantas. En una modalidad, se puede modificar cualquier medio adecuado de cultivo de tejidos vegetales al incluir sustancias adicionales, tales como reguladores del crecimiento. Los tejidos vegetales se pueden mantener en un medio básico con reguladores del crecimiento hasta que haya suficiente tejido disponible para comenzar los esfuerzos de regeneración vegetal. De manera alternativa, siguiendo las rondas repetidas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración (por ejemplo, al menos 2 semanas), se puede transferir luego el tejido al medio que es propicio para la formación de brotes. Los cultivos son transferidos periódicamente hasta que haya ocurrido una formación suficiente de brotes. Una vez que se han formado los brotes, se transfieren al medio que es propicio para la formación de raíces. Una vez que se han formado las raíces, las plantas se pueden transferir al suelo para el crecimiento y madurez adicional.

Para confirmar la presencia de un ácido nucleico deseado que comprende construcciones proporcionadas en plantas regeneradoras, se pueden llevar a cabo una variedad de ensayos. Dichos ensayos pueden incluir: ensayos biológicos moleculares, tales como la transferencia *Southern* y *Northern*, y PCR; ensayos bioquímicos, tales como detectar la presencia de un producto de proteína mediante medios inmunológicos, tales como ELISA, transferencias western y/o espectrofotometría LC-MS MS) o mediante la función enzimática, tales como, mediante ensayos de partes de plantas, tales como ensayos de hojas, callos o polen; y/o análisis del fenotipo de toda la planta regenerada.

Los eventos transgénicos se pueden analizar, por ejemplo, mediante amplificación PCR usando cebadores de oligonucleótido específicos para las moléculas de ácido nucleico de interés. Se entiende que el genotipo de PCR incluye, pero de modo no taxativo, la amplificación PCR del ADN genómico derivado del tejido vegetal huésped purificado y/o aislado previsto para contener una molécula de ácido nucleico de interés integrada en el genoma, seguida de la clonación estándar y

análisis de secuencias de productos de amplificación PCR. Se han descrito bien los métodos del genotipo PCR (véase, por ejemplo, Rios *et ál.* (2002) *Plant J.* 32:243-53) y se puede aplicar al ADN genómico derivado de cualquier especie vegetal o tipo de tejido que incluye cultivos celulares.

Las combinaciones de cebadores de oligonucleótidos que se unen tanto a la secuencia diana como a la secuencia introducida se pueden utilizar secuencialmente o multiplexadas en las reacciones de amplificación PCR. Se pueden producir cebadores de oligonucleótidos diseñados para escindirse al sitio diana, secuencias de ácido nucleico introducido y/o combinaciones de dos tipos de secuencias de ácido nucleico. Por lo tanto, las estrategias del genotipo PCR pueden incluir, por ejemplo y sin limitación: amplificación de secuencias específicas en el genoma vegetal; amplificación de múltiples secuencias específicas en el genoma vegetal; amplificación de secuencias no específicas en el genoma vegetal; y combinaciones de cualquiera de las anteriores. Un experto en la técnica puede idear combinaciones adicionales de cebadores y reacciones de amplificación para interrogar al genoma. Por ejemplo, se puede diseñar un conjunto de cebadores de oligonucleótidos inversos y directos para escindirse con las secuencia/s de ácido nucleico específicas para la diana fuera de los límites de la secuencia de ácido nucleico introducida.

Los cebadores de oligonucleótidos inversos y directos se pueden diseñar para escindirse específicamente con una molécula de ácido nucleico introducido, por ejemplo, a una secuencia correspondiente a una región de codificación dentro de una secuencia de nucleótidos de interés compuesta de estos u otras partes de la molécula de ácido nucleico. Se pueden utilizar cebadores junto con los cebadores que se describen en la presente. Los cebadores de oligonucleótidos se pueden sintetizar de acuerdo con una secuencia deseada y está disponible comercialmente (por ejemplo, de Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA). La amplificación puede estar seguida por la clonación y secuenciamiento o por el análisis de secuencias directas de productos de amplificación. En una modalidad, los cebadores de oligonucleótidos específicos para la diana génica se utilizan en las amplificaciones de PCR.

Método para expresar un transgén

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende hacer crecer una planta que comprende un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) operativamente unido 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 un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) operativamente unido a al menos un transgén.

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende hacer crecer una planta que comprende un casete de expresión génica de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) operativamente unido 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 tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de expresión génica de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) operativamente unido a al menos un transgén.

En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) operativamente unido a un transgén. donde, el promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) se compone de un promotor corriente arriba (SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6), y un intrón (SEQ ID NO: 8). En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor corriente arriba de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6), y un intrón (SEQ ID NO: 8). En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor corriente arriba de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6), y un intrón (SEQ ID NO: 8) de un gen de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1. En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor corriente arriba de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1

(SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6), y un intrón (SEQ ID NO: 8) de un gen de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o célula vegetal comprende un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1. En una modalidad, un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 puede ser la SEQ ID NO: 2. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor, donde el promotor es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % idéntico a la SEQ ID NO: 2. En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unido a un transgén. En una modalidad ilustrativa, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unido a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN y un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o célula vegetal comprende un promotor corriente arriba de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1. En una modalidad, un promotor corriente arriba de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 puede ser la SEQ ID NO: 4. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor corriente arriba, donde el promotor corriente arriba es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % idéntico a la SEQ ID NO: 4. En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor corriente arriba de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unido a un transgén. En una modalidad ilustrativa, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor corriente arriba de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unido a un transgén,

donde el transgén puede ser un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN y un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o célula vegetal comprende una 5'-UTR o secuencia líder de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1. En una modalidad, una 5'-UTR o secuencia líder de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 puede ser un polinucleótido de la SEQ ID NO: 6. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR, donde la 5'-UTR o secuencia líder es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 6. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR o líder de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unida a un promotor, donde el promotor es un promotor de la Ubiquitina o un promotor que proviene de una planta (por ejemplo, promotor de la ubiquitina 1 de *Zea mays* o *Zea luxurians*), un virus (por ejemplo, promotor del virus del mosaico de la mandioca), o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR o líder que está operativamente unida a un transgén. En una modalidad ilustrativa, una planta, tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de expresión génica comprende una Ubi-1 o líder de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unida a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN y un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o célula vegetal comprende un intrón de la Ubi-1. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o célula vegetal comprende un intrón de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1. En una modalidad, un intrón de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 puede ser un polinucleótido de la SEQ ID NO: 8. En una modalidad,

una planta, un tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un intrón, donde el intrón es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % idéntico a la SEQ ID NO: 8. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unido a un promotor, donde el promotor es un promotor de la Ubi-1 o un promotor que proviene de una planta (por ejemplo, promotor de la ubiquitina 1 de *Zea mays* o *Zea luxurians*), un virus (por ejemplo, promotor del virus del mosaico de la mandioca), o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un intrón de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unido a un transgén. En una modalidad ilustrativa, una planta, tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unido a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN y un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende una casete de expresión génica que comprende un promotor corriente arriba de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1, un intrón de la Ubi-1 y una 5'-UTR de la Ubi-1 que está operativamente unida a un transgén. El promotor de la Ubi-1 de la *Z. luxurians* v1, un intrón de la Ubi-1 y una 5'-UTR de la Ubi-1 pueden estar operativamente unidos a diferentes transgenes dentro del 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 la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unido a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN y un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En

una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un intrón de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unido a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN y un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón de la Ubi-1 que está operativamente unido a un promotor, donde el promotor es un promotor de la Ubiquitina o un promotor que proviene de una planta (por ejemplo, promotor de la ubiquitina 1 de *Zea mays* o *Zea luxurians*), un virus (por ejemplo, promotor del virus del mosaico de la mandioca), o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente unida a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN y un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un vector que comprende un elemento regulador de promotores de genes constitutivos tal como se describe en la presente. En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un vector que comprende un elemento regulador de promotores de genes constitutivos tal como se describe en la presente, operativamente unido a un transgén. En una modalidad, una planta, tejido vegetal o 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, tejido vegetal o célula vegetal, de acuerdo con los métodos que se describen en la presente, puede ser una monocotiledónea. La planta monocotiledónea, tejido vegetal o

célula vegetal puede ser, pero de modo no taxativo, maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, cebada, centeno, sorgo, orquídea, bambú, banana, totora, lirio, avena, cebolla, mijo y triticale. En otra modalidad, una planta, tejido vegetal o 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, pero de modo no taxativo, semilla de colza, colza, mostaza india, mostaza de Etiopía, soja, girasol y algodón.

Con respecto a la producción de plantas genéticamente modificadas, se conocen bien los métodos para la ingeniería genética de las plantas. Por ejemplo, se han desarrollado numerosos métodos para la transformación vegetal, lo que incluye protocolos de transformación física y biológica para las plantas dicotiledóneas así como también para las 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)). Además, los vectores y los métodos de cultivo *in vivo* para la transformación y regeneración de células vegetales o tejido de plantas se encuentran disponibles, 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).

Un experto en la técnica reconocerá que luego de que la secuencia exógena se haya incorporado en forma estable en las plantas transgénicas y confirmado que es operable, que se puede introducir en otras plantas mediante el cruzamiento sexual. Es posible utilizar cualquier cantidad de técnicas de cultivo estándar, dependiendo de las especies que se van a cruzar.

Se puede identificar y aislar una célula vegetal transformada, raíz, hoja, callo, polen, tejido o planta mediante la selección o análisis del material vegetal modificado para atributos codificados mediante los genes marcadores presentes en el ADN transformador. Por ejemplo, la selección se puede realizar haciendo crecer el material vegetal modificado en un medio que contiene una cantidad

inhibidora de un antibiótico o herbicida al cual la construcción génica transformante confiere resistencia. Adicionalmente, las células transformadas se pueden identificar también mediante el análisis de las actividades de genes marcadores visibles (por ejemplo, los genes YFP, GFP, β -glucuronidasa, Luciferasa, B o C1) que pueden estar presentes en las construcciones de ácido nucleico recombinante. Los expertos en la técnica conocen bien dichas metodologías de selección y análisis.

También se pueden utilizar métodos físicos y bioquímicos para identificar transformantes vegetales o células vegetales que contienen construcciones génicas insertadas. Estos métodos incluyen, pero de modo no taxativo: 1) Análisis *Southern* o amplificación PCR para detectar y determinar la estructura de la inserción de ADN recombinante; 2) transferencia *Northern*, protección S1 RNasa; cebador-extensión, o amplificación PCR transcriptasa inversa para detectar y examinar transcripciones de ARN de las construcciones génicas; 3) ensayos enzimáticos para detectar actividad de enzimas o ribozimas, donde dichos productos génicos se codifican mediante la construcción génica; 4) análisis de secuenciación de la siguiente generación (NGS); o 5) electroforesis en gel de proteínas, técnicas de transferencia western, inmunoprecipitación, o ensayo inmunsorbente unido a enzimas (ELISA), donde los productos de la construcción génica son proteínas. También se pueden utilizar técnicas adicionales, tales como la hibridación *in situ*, la tinción enzimática y la inmunotinción para detectar la presencia o expresión de la construcción recombinante en órganos vegetales y tejidos específicos. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para llevar a cabo todos estos ensayos.

Se pueden observar los efectos de la manipulación génica usando los métodos que se describen en la presente mediante, por ejemplo, transferencias *Northern* del ARN (por ejemplo, ARNm) aislado de los tejidos de interés. Normalmente, si el ARNm está presente o si la cantidad de ARNm aumentó, se puede asumir que el transgén correspondiente se está expresando. Se pueden utilizar otros métodos de medición génica y/o actividad de polipéptido

codificados. Se pueden utilizar distintos tipos de ensayos enzimáticos, dependiendo del sustrato utilizado y el método para detectar el aumento o disminución de un producto o subproducto de reacción. Además, los niveles de polipéptidos expresados se puede medir de forma inmunoquímica, mediante el uso de ELISA, RIA, EIA y otro anticuerpo basado en ensayos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, mediante ensayos de detección electroforéticos (ya sea con tinción o transferencia western). Como un ejemplo no taxativo, se describe la detención del AAD-1 (ariloxialcanoato dioxigenasa; véase WO 2005/107437) y proteínas PAT (fosfinotricina-N-acetil-transferasa) usando un ensayo ELISA en la publicación de patente estadounidense N.º 20090093366 que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Además, el transgén se puede expresar selectivamente en algunos tipos de célula o tejidos de la planta o en algunas fases de desarrollo. El transgén se puede expresar también en forma sustancial en todos los tejidos vegetales y durante todo su ciclo de vida. Sin embargo, también es aplicable cualquier modo de expresión combinatoria.

La presente descripción también abarca semillas de las plantas transgénicas que se describieron anteriormente, donde la semilla comprende el gen reportero, transgén o casete de expresión génica. La presente descripción abarca también la progenie, clones, líneas celulares o células de las plantas transgénicas que se describieron anteriormente, donde dicha progenie, clon, línea celular o célula comprende el gen marcador, transgén o construcción génica.

Si bien la invención se ha descrito con referencia a métodos y modalidades específicas, se debe apreciar que es posible realizar varias modificaciones y cambios sin alejarse de la invención que se describe en la presente memoria.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación y aislamiento de nuevos promotores

Se amplificó una secuencia de promotor nuevo a partir del gen de *Z. luxurians* v1 usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Los oligonucleótidos (Tabla 1) diseñados para amplificar el promotor nuevo, *Z. luxurians* v1 provinieron de las regiones conservadas de la secuencia promotora de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v., que sirvió como control. Se obtuvo un producto PCR de *Z. luxurians* v1 y se caracterizó.

El producto PCR que comprende el promotor nuevo se clonó en ventores Topo™ usando un kit de clonación de PCR Invitrogen Zero Blunt® TOP0® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se proporciona un mapa del vector que muestra el plásmido clonado que comprende el producto PCR del promotor nuevo. El plásmido pDAB105710 corresponde a *Z. luxurians* v1 (la FIG. 2).

Tabla 1: Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de los nuevos promotores de la Ubi-1

		La ID
		Sec.
		Nº.:
Cebador	directo:	
<u>GCTACCGCGGACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAATG</u>		9
Cebador inverso:	<u>AGTCAGGTACCCTGCAGAAGTAACACCAACAACAG</u>	10

Se subraya la secuencia específica de promotores de los cebadores de PCR. La secuencia de cebadores ubicada 5' antes de la secuencia específica de promotores es una secuencia enlazadora utilizada para la clonación.

Después de la clonación, se secuenció la inserción del promotor que contiene el producto PCR usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las secuencias de polinucleótidos del promotor de *Z. luxurians* v1 (FIG. 4) se alinearon en forma informática y posteriormente se analizaron para la homología de secuencias con la secuencia de control de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. (FIG. 3). Se utilizaron métodos informáticos y/o programas informáticos conocidos por los expertos en la técnica, tales como ClustalW o Sequencher para realizar el análisis de homología de secuencias.

Ejemplo 2: Caracterización de nuevos promotores

El análisis de homología de secuencias (FIGS. 3-7), que incluye el alineamiento y comparación de secuencias con la secuencia de control de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. (SEQ ID NO: 1; la FIG. 3) relevó un nuevo promotor de la Ubi-1 para la caracterización

Tabla 2: (%) de homología de secuencias entre el promotor de la Ubi-1 B73 <i>Z. mays</i> y el nuevo promotor de la Ubi-1						
Promotor	promotor corriente 5'-					Elemento de choque térmico
	Total	arriba	UTR/Líder	Intrón	Caja TATA	
<i>Z. luxurians</i> v1	90,4	87,8	98,8	91,7	100	100

adicional. Se observó que la nueva secuencia promotora de la Ubi-1, obtenido de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2; la FIG. 4) estaba compuesto por secuencias de polinucleótidos de tres regiones diferentes; 1) región del promotor corriente arriba (SEQ ID NO: 4), 2) a 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) y 3) un intrón (SEQ ID NO: 8). Las regiones del promotor y los elementos del promotor específico de *Z. luxurians* v1 se analizaron para determinar la homología de secuencias con respecto a la secuencia de control de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. (FIGS. 5-7). Más específicamente, la alineación de secuencias se llevó a cabo para comparar independientemente el promotor corriente arriba, 5'-UTR, y las regiones intrónica, así como también la caja TATA y los elementos reguladores del elemento de choque térmico (HSE) del promotor de *Z. luxurians* v1 para las regiones correspondientes de la secuencia de control de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. (Figuras 5-7, Tabla 2).

La FIG. 5 muestra la alienación de secuencias de las regiones del promotor corriente arriba del promotor de *Z. luxurians* v1 en comparación con la región del promotor corriente arriba de la secuencia promotora de control de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. La FIG. 6 muestra la alienación de secuencias de la 5'-UTR o secuencia líder del promotor de *Z. luxurians* v1 en comparación con la 5'-UTR o secuencia líder de la secuencia promotora de control de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. La FIG. 7 muestra la alienación de secuencias de las regiones del promotor corriente arriba del promotor de *Z.*

luxurians v1 en comparación con la región del promotor corriente arriba de la secuencia promotora de control de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v.

Los elementos del promotor obtenidos de *Z. luxurians* v1 mostraron un total de identidad de secuencias de 90,4 % (Tabla 2) con la secuencia de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. La caracterización de la secuencia promotora nueva de *Z. luxurians* v1 confirmó que la mayoría de los elementos reguladores del promotor (es decir, una caja TATA o elemento de choque térmico) encontrado normalmente en un promotor funcional, también se conservaron muy bien dentro de las regiones promotoras centrales del gen de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (Tabla 2). Por ejemplo, la Figura 5 muestra una caja TATA muy conservada (869-876 pares de bases se muestran subrayados) que se identificó y se descubrió que se encontraba ubicada aproximadamente a 5' anterior de 50 bp de la TSS en la región del promotor corriente arriba del nuevo promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1. Mientras se observaron únicamente niveles pequeños de variación en la 5'-UTR o secuencia líder del promotor nuevo de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (la Figura 4) que tuvo 98,8 % de homología de secuencias con la secuencia de control de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. (Figura 6), también se identificaron áreas de conservación de secuencias inferiores en la región promotora corriente abajo (Figura 5) y la región de intrones (Figura 7).

Las regiones promotoras corriente arriba del promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 mostraron variaciones del promotor corriente arriba de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. que tiene únicamente 87,8 % de homología de secuencia (Tabla 2). La mayoría de las diferencias identificadas en la región promotora corriente arriba de *Z. luxurians* v1 se componen de eliminaciones, sustituciones y/o discordancias de nucleótidos (Figura 5). En particular, se encontró una eliminación de 12-13 bp ubicada dentro de la corriente arriba 5' de 100 bp del elemento promotor de la caja TATA en el promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (se muestran en cajas de 773-784 pares de bases). De manera similar, la FIG. 5 muestra dos superposiciones de secuencias de elementos de choque térmico (HSE) (se muestran rodeadas de 457 - 481 y 482 - 500 de pares de bases,

respectivamente) que no se conservaron en el promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 analizado en este estudio.

Además, existen motivos reguladores adicionales en la región promotora corriente arriba de la Ubi-1 que se extiende corriente arriba 5' de 100-200 bp de la TSS. Estos motivos se unen a los factores de la transcripción que interactúan con el complejo de iniciación transcripcional y facilita su ensamblaje, mejora su estabilidad o aumenta la eficacia del escape promotor una vez que se activa la maquinaria transcripcional (Peremarti et ál. 2010). Por lo tanto, se observaron eliminaciones, sustituciones y discordancias como estas dentro de la región reguladora en el promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (Figura 5), que podrían afectar potencialmente tanto la fuerza como la especificidad del promotor.

También se identificó la variación de secuencias en las regiones de intrones del promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians*. Si bien el promotor de la Ubi-1 de *Z. luxurians* compartió niveles relativamente conservados de identidad de secuencia (es decir, 91,7 %) con la secuencia promotora de control de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. (Tabla 2), la secuencia promotora intrónica de *Z. luxurians* v1 también contenía dos eliminaciones significativas de aproximadamente 17 bp y 8 bp, respectivamente (Figura 7) que no se identificaron en la secuencia de control. La eliminación de 17 bp se ubicó a aproximadamente 195 bp de corriente abajo 3' de la TSS (se mostraron en cajas de 120-136 de pares de bases) y la eliminación de 8 bp se ubicó en aproximadamente 710 bp de corriente abajo 3' de la TSS (se muestran subrayadas 626-633 pares de bases).

Ejemplo 3: Construcción de vectores usando los nuevos promotores para la expresión génica

A menos que de indique de otra manera, las manipulaciones biológicas y bioquímicas que se describen en este y posteriores Ejemplos se llevaron a cabo mediante metodologías estándar tal como se describe en, por ejemplo, Ausubel et ál. (1995), y Sambrook et ál. (1989) y actualizaciones de estos. Las construcciones

utilizadas en los experimentos se describen más detalladamente a continuación (Tabla 3).

El promotor de *Z. luxurians* que comprende el promotor corriente arriba, 5'-UTR y regiones intrónicas, como se describe anteriormente, se extrajeron del gen de la Ubi-1 de la especie *Z. luxurians* y los amplicones de PCR se purificaron en gel usando QIAquick Gel Extraction Kit® (Qiagen Carlsbad, CA). La secuencia de polinucleótidos del promotor se clonó luego en un Gateway Entry Vector® (Invitrogen) usando técnicas de clonación estándar conocidas en la técnica. El Gateway Entry Vector® resultante que comprende la secuencia promotora de la Ubi-1 para *Z. luxurians* v1 se confirmó mediante la digestión de restricción y secuenciamiento. También se clonó un vector de entrada de control que comprende la secuencia promotora de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. en un vector de puerta de entrada usando técnicas de clonación estándar en el técnica.

Además de las secuencias promotoras de la Ubi-1, el vector de entrada también estaba compuesto del gen reportero de la *proteína amarilla fluorescente* de *Phialidium species* (*PhiYFP*; Shagin, D. A., (2004) *Mol Biol Evol.* 21;841-50) con un intrón ST-LS1 incorporado en la secuencia (Vancanneyt, G., (1990) *Mol Gen Genet.* 220;245-50) y la región 3'-UTR del gen 5 de la Peroxidasa de *Zea mays* (*ZmPer5*; patente estadounidense N.º 6,699,984). Se proporcionan mapas de vectores que muestran los vectores de entrada clonados que comprenden cada una de las secuencias promotoras. La construcción pDAB105742 corresponde al vector de entrada de control que comprende la secuencia promotora de la Ub-1 B73 de *Z. mays* c.v. La construcción pDAB105737 corresponde al vector de entrada que comprende la secuencia promotora de *Z. luxurians*. Por lo tanto, se establecieron los vectores de entrada que comprenden casete de expresión génica que comprenden un promotor de la Ubi-1 de *Zea species*, el *Phigen YFP* y la *ZmPer5* 3'-UTR.

Tal como se describe en la Tabla 3, se construyó una construcción de vectores de expresión binaria que comprende el gen reportero *PhiYFP* estimulado por la nueva secuencia reportera y terminada por

la *ZmPer5* 3'-UTR. La transformación o expresión de vectores para la transformación de embriones de maíz mediado por *Agrobacterium* se construyó mediante el uso de métodos de clonación estándar y reacciones de recombinación Gateway® que emplean un vector binario de destino estándar, pDAB101917 y los vectores de entrada que

Tabla 3: Construcción de vectores de expresión génica binaria						
Construcción del vector	Construcción del vector de entrada			Construcción del vector de destino		
	Promotor	Transgén	3'-UTR	Promotor	Gen reportero	3'-UTR
						Figura

comprenden el casete de expresión génica, tal como se describió anteriormente.

El vector de destino binario, pDAB101917, se compone de un gen tolerante a los herbicidas *phosphinothricin acetyltransferase* (PAT; Wehrmann *et ál.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14:1274-1278). En el vector pDAB101917, la expresión génica PAT estaba bajo el control de un promotor de la Ubi-1 de *Z. mays*, 5'-UTR y un intrón. El vector pDAB101917 también se compone de un región 3'-UTR del gen lipasa de *Z. mays* (*ZmLip*; patente estadounidense N.º 7,179,902). La 3'-UTR *ZmLip* se utilizó para determinar la transcripción del ARNm PAT. La reacción de recombinación Gateway® permitió la inserción de cada vector de entrada que comprende el casete de expresión génica (es decir, el promotor de la Ubi-1 de a *Z. luxurians* v1 o *Z. mays* c.v., el gen *PhiYFP* y la 3'-UTR *ZmPer5*) en el vector binario de destino pDAB101917. Los vectores de entrada se insertaron en el vector de destino pDAB101917 entre los límites A y B del ADN T y corriente arriba del casete de expresión PAT.

binario							
pDAB105748	<i>Z. mays</i> c.v. B73 Ubi-1	<i>PhiYFP</i>	<i>ZmPer5</i>	<i>Z. mays</i> Ubi-1	PAT	<i>ZmLip</i>	8
pDAB105743	<i>Z. luxurians</i> v1 Ubi-1	<i>PhiYFP</i>	<i>ZmPer5</i>	<i>Z. mays</i> Ubi-1	PAT	<i>ZmLip</i>	9

Se proporcionan los mapas de vectores que muestran la construcción de expresión binaria, pDAB101917 con los casetes de expresión génica que se componen de un promotor de la Ubi-1 de *Z. mays* o *Z. luxurians* , el gen *PhiYFP* y la 3'-UTR *ZmPer5* incorporada. La construcción de control, pDAB105748, corresponde al casete de expresión génica que comprende el promotor de la Ub-1 B73 de *Z. mays* c.v. 8). Además, la construcción pDAB105743 corresponde al casete de expresión génica que comprende la secuencia promotora de la Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (Figura 9).

Ejemplo 4: Transformación vegetal

Las construcciones del vector binario, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73) y pDAB105743 (*Z. luxurians* v1) se transformaron cada uno en la cepa *Agrobacterium tumefaciens*, EHA101, usando las técnicas de transformación estándar conocidas en la técnica. Las colonias bacterianas se aislaron y el ADN plásmido binario se extrajo, se purificó y se confirmó mediante la digestión enzimática de restricción.

Se llevó a cabo la transformación de las plantas de maíz de acuerdo con el protocolo descrito en Vega et ál., 2008, *Plant Cell Rep* 27:297-305 que utilizó la transformación mediada por *Agrobacterium* y el gen *fosfinotricina acetiltransferasa*(PAT; Wehrmann et ál., 1996, *Nature Biotechnology* 14:1274-1278) como un marcador vegetal seleccionable. Los cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* que comprenden las construcciones del vector binario (descrito anteriormente) se utilizaron para transformar las plantas Hi-II de *Z. mays* c.v. y producir la primera ronda, T₀, de eventos de maíz transgénico (Tabla 4). Los embriones cigotos inmaduros se produjeron, prepararon y cultivaron 2,5 meses después de la transformación.

Los resultados de la transformación para las construcciones de expresión génica individuales se describen más detalladamente en la Tabla 4. Se proporciona la cantidad total de embriones producidos, la cantidad total de eventos transgénicos observados en la fase de callo y en la planta total, así como también el porcentaje de eficacia de transformación general. La eficacia de transformación general de las construcciones de expresión binaria es menor a la que se informó previamente (Vega et ál., 2008) debido al bajo vigor embrionario en muchos experimentos.

Tabla 4: Primera ronda, T ₀ , resultados de la transformación del maíz				
Construcción del vector binario	Total # de embriones	Cantidad de callos	Cantidad de eventos transgénicos	Eficacia (%)
pDAB105748	545	221	33	6,1
pDAB105743	632	228	28	4,4

Ejemplo 5: Análisis de la cantidad de copias de transgenes

La integración estable del transgén *PhiYFP* dentro del genoma de las plantas transgénicas de *Z. mays* se confirmó mediante un ensayo de sonda de hidrólisis. Las plántulas *Z. mays* transgénicas transformadas de forma estable que se desarrollan a partir del callo se obtuvieron y analizaron para identificar eventos que contienen una poca cantidad de copias (es decir, 1-2 copias) de inserciones de cepa T de longitud completa.

El sistema Roche Light Cycler 480™ se utilizó para determinar la cantidad de copias transgénicas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El método utilizó una reacción de PCR TaqMan® bipleja que utilizó oligonucleótidos específicos para el gen *PhiYFP* y para el gen de referencia endógeno *Z. mays* Invertasa (*ZmInv*; Número de acceso Genbank: U16123.1) en un ensayo único. Se determinó la cantidad de copias y la cigosidad mediante la medición

de la intensidad de la fluorescencia específica para *PhiYFP*, relacionado con la fluorescencia específica para *ZmInv*, en comparación con la cantidad de copias estándar.

Un fragmento de ADN específico para genes *PhiYFP* se amplificó con un conjunto de cebadores/sondas TaqMan® que contienen una sonda etiquetada con tinte fluorescente FAM™ y *ZmInv* se amplificó con un segundo conjunto de cebadores/sondas de TaqMan® que contiene una sonda etiquetada con fluorescencia HEX™ (Tabla 5) . Los cebadores y sondas para el análisis de cantidad de copias se sintetizaron en forma comercial por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). El resto fluorescente FAM™ se excitó en una densidad óptica de 465/510 nm y el resto fluorescente se excitó en una densidad de 533/580 nm.

Las reacciones se prepararon en un volumen de reacción final de 10 µl usando reactivos, tal como se describe en la Tabla 6. Los fragmentos de ADN específico para genes se amplificaron de acuerdo con las condiciones de termociclaje que se establecen en la Tabla 7. Se determinó la cantidad de copias y la cigosidad de las muestras mediante la medición de la intensidad relativa de fluorescencia específica para el gen reportero, *PhiYFP*, a la fluorescencia específica para el gen de referencia, *ZmInv*, en comparación con las normas de cantidad de copias.

Se crearon normas de cantidad de copias diluyendo el vector, pDAB108706, en el ADN genómico B104 *Z. mays* c.v. para obtener estándares con una relación conocida de pDAB108706:ADNg. Por ejemplo, se prepararon muestras que tienen uno, dos y cuatro copias del ADN de vector por una copia del ADNg B104 de *Z. mays* c.v. Se mezclaron una o dos diluciones de copia del pDAB108706 con el *Z. mays* c.v. Los estándares del ADNg B104 se validaron contra un evento de control de *Z. mays* que era conocido por ser hemicigoto y un evento de control *Z. mays* que era conocido por ser homocigoto (es decir, evento 278 de *Z. mays*; véase la publicación de patente internacional PCT N.º WO 2011/022469 A2).

Se realizó un ensayo de amplificación por PCR biplejo de TaqMan® que utiliza oligonucleótidos específicos para el gen PAT y el gen de referencia s *ZmInv* endógeno, respectivamente. Se empleó la amplificación por PCR para detectar un fragmento de ADN específico para genes para PAT con un conjunto de cebadores de TaqMan® y una sonda etiquetada con tinte fluorescente FAM™ (Tabla 5). También se utilizó un segundo conjunto de cebadores y una sonda etiquetada con tinte fluorescente HEX™ para amplificar y detectar el gen de control/referencia endógeno *ZmInv* (Tabla 5). La mezcla de reacción de PAT TaqMan® se preparó como se establece en la Tabla 6 y los fragmentos específicos se amplificaron de acuerdo con las condiciones establecidas en la Tabla 7.

Tabla 5: Cebadores y Sondas para ensayos de cantidad de copias			
Gen	Cebador/Sonda	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID N.º:
<i>PhiYFP</i>	Cebador directo	CGTGTTGGGAAAGAACTTGGA	11
	Cebador inverso	CCGTGGTTGGCTTGGTCT	12
	Sonda (secuencia/marcador fluorescente)	5' FAM/CACTCCCCACTGCCT	13
<i>ZmInv</i> Control	Cebador directo	TGGCGGACGACGACTTGT	14
	Cebador inverso	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT	15
	Sonda (secuencia/marcador fluorescente)	5' HEX/CGAGCAGACCGCCGTGTACTT	16
PAT	Cebador directo	ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGT	17
	Cebador inverso	CTTTGATGCCTATGTGACACGTAAACAGT	18
	Sonda (secuencia/marcador fluorescente)	5' FAM/GGTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGG	19

Los resultados del análisis de la cantidad de copias del transgén de las plantas transgénicas se obtuvo mediante la transformación de diferentes construcciones promotores se muestran en la Tabla 8. Se transfirieron únicamente las plantas con 1 a dos copias del transgén *PhiYFP* al invernadero y se cultivaron para análisis de expresión adicionales.

Tabla 6:			
Reactivo	Concentración de trabajo	Volumen (µl)	Concentración final
Agua	--	0,5	--
Roche LightCycler Master Mix	2X	5	1X
Cebador directo <i>Phi</i> YFP	10 µM	0,4	400nM
Cebador inverso <i>Phi</i> YFP	10 µM	0,4	400 nM
<i>Phi</i> YFP Sonda-FAM etiquetada	5 µM	0,4	200nM
Cebador directo <i>ZmInv</i>	10 µM	0,4	400 nM
Cebador inverso <i>ZmInv</i>	10 µM	0,4	400 nM
<i>ZmInv</i> Sonda-HEX etiquetada	5 µM	0,4	200 nM
Polivinilpirrolidona (PVP)	10 %	0,1	0,10%
Plantilla de ADN genómico:	~5 ng/µl	2	~10 ng/µl

Tabla 7: Condiciones termocíclicas para la amplificación de PCR de cantidad de copias			
Etapa PCR	Temperatura (°C)	Tiempo	Cantidad de ciclos
1	95	10 minutos	1
2	95	10 segundos	40
	58	35 segundos	
	72	1 segundo	
3	40	10 segundos	1

Tabla 8: Análisis de la cantidad de copias de transgenes de plantas transgénicas			
Construcción	Eventos analizados	Simple (1-2 copias)	Complejo (>2 copias)
105748	21	15	6
105743	22	4	18

Ejemplo 6: Cuantificación ELISA de las proteínas *Phi*YFP y PAT

Se tomaron muestras de las plantas en la fase V4-5 de desarrollo usando ensayos ELISA de hojas. Las muestras se recopilaron en placas de tubos de recolección de 96 pocillos y se tomaron 4 discos

de hoja (tamaño de papel perforado) para cada muestra. Se agregaron a cada tubo dos BBs de 4,5 mm (Daisy corporation, Roger, AR) y 200 μ L de amortiguador de extracción [1x PBS complementado con 0,05 % de Tween®-20 y 0,05 % de BSA (Millipore Probumin®, EMD Millipore Corp., Billerica, MA)]. Se agregaron otros 200 μ L de amortiguador de extracción a cada tubo seguido de la inversión para mezclar. Las placas se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se transfirió a los pocillos correspondientes en un pocillo profundo 96 almacenado en hielo. Las placas Maxi-Sorp de 96 pocillos Nunc® Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) se utilizaron para ELISA. Las placa se recubrieron con un anticuerpo de captura anti-YFP monoclonal de ratón (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD). El anticuerpo se diluyó 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 nocturnas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20-30 minutos antes de lavar 4 x con 350 μ L de amortiguador de lavado [1x PBS complementado con 0,05 % de Tween®-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)].

Las placas se bloquearon con 200 μ L por pocillo de amortiguador de bloqueo [1x PBS complementado con 0,05 % de Tween®-20 más 0,5 % de BSA (Millipore Probumin®)] durante un mínimo de 1 hr a +37 °C seguido de 4x lavados con 350 μ L de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash™ 2, Tomtec, Inc., Hamden, CT).

Para ELISA YFP, se utilizó como estándar un recombinante Evrogen Phi-YFP de 1 mg/mL (Axxora LLC, Farmingdale, NY). Se utilizó una curva estándar de ajuste de 5 parámetros (entre los valores 1 ng/ml y 0,125 ng/ml) para asegurar que todos los datos queden dentro de la parte lineal de la curva. Se agregaron 100 μ L de estándar o muestra al pocillo. Se utilizó un mínimo de dilución 1:4 de la muestra en el amortiguador de ensayo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas (250 rpm; agitador de placas de titulación) seguido de 4x lavados con 350 μ L de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash™ 2). Se agregaron aproximadamente 100 μ L de anticuerpo anti-PhiYFP policlonal de conejo Evrogen de 1 μ g/mL (Axxora) a cada pocillo.

Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas a 250 rpm, seguido de 4x lavados con 350 μ L de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash™ 2). A continuación, se diluyeron 100 μ L de anticuerpo secundario IgG HRP anticonejo (Thermo Scientific) 1:5000 en amortiguador de bloqueo/ensayo, al que se cuantificaron las proteínas PAT usando un kit de Envirologix (Portland, ME). Se llevaron a cabo ELISAS usando múltiples diluciones de extractos vegetales y reactivos e instrucciones esencialmente tal como lo proporcionaron los proveedores.

Ejemplo 7: Expresión vegetal estable de transgenes operativamente unidos a nuevos promotores

Se observó la expresión proteica en los tejidos vegetales transgénicos. Por ejemplo, se observó la expresión de *PhiYFP* en callos de plantas T_0 que se transformaron en forma estable mediante el cocultivo con *Agrobacterium*. Las plantas transgénicas se cultivaron a partir de embriones transformados de *Z. mays* usando construcciones de vectores binarios que comprenden el promotor nuevo, pDAB105743 (*Z. luxurians* v1, FIG. 9) y el promotor de control, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73, FIG. 8). Se observaron callos vegetales en un estereomicroscopio Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL) usando un filtro YFP y una fuente de luz de 500 nm. Se muestran en la Figura 10 ejemplos representativos de la expresión estable de *PhiYFP* observada en el tejido del callo de las plantas de maíz T_0 transgénicas que comprenden pDAB105743 en comparación con el control, 10. Los datos confirman que el promotor nuevo que comprende pDAB105743 (*Z. luxurians* v1), tal como se describe en la presente memoria, es capaz de conducir la expresión fuerte del gen *PhiYFP* en el tejido del callo de las plantas transgénicas T_0 .

Como se describe en la Tabla 8, las plantas completas que contenían una baja cantidad de copias (es decir, 1-2 copias) del transgén *PhiYFP* se cultivaron en un invernadero. En general, se utilizaron aproximadamente cinco (5) a aproximadamente diez (10) eventos por construcción y aproximadamente cinco (5) plantas por evento para el análisis de la expresión T_1 . Los datos de ELISA revelaron expresión

consistente de la proteína *PhiYFP* en las hojas de las plantas de maíz T₁ usando construcciones de vectores que comprenden el promotor nuevo, pDAB105743 (*Z. luxurians* v1), en comparación con la construcción de control, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73).

Se observó una expresión de proteínas *PhiYFP* media de aproximadamente 142,5 ng/mg (+/- 35,9 ng/mg) de *PhiYFP* para la plantas T₁ que comprenden la construcción del promotor nuevo, pDAB105743 (*Z. luxurians* v1, FIG. 9), en comparación con aproximadamente 285,3 ng/mg (+/- 22,7 ng/mg) de proteína *PhiYFP* producida por la planta de control que comprende la construcción de control, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73, FIG. 8). Estos resultados confirman que el promotor nuevo de *Z. luxurians* v1, como se describe en la presente memoria, era útil en la producción de atributos transgénicos en altos niveles de producción de proteínas.

Además, la expresión PAT media para todas las plantas T₁ que comprenden pDAB105743 (*Z. luxurians* v1) era de aproximadamente 59,0 ng/mg (+/- 11.6 ng/mg) en comparación con aproximadamente 105,8 ng/mg (+/- 7.4 ng/mg) de proteína PAT producida por la planta de control que comprende pDAB105748 del promotor B73 de *Z. mays* c.v. En general, la expresión de la proteína PATA para todas las plantas de maíz fue significativamente menor que la expresión observada para el gen *PhiYFP* en las plantas de maíz.

La expresión de proteínas *PhiYFP* también se midió en el polen procedente de las panojas de las plantas transgénicas T1 seleccionadas que representan cada uno de las construcciones promotores nuevos que se describen en la presente. Tal como se muestra en la FIG. 11, el análisis de imágenes del polen transgénico confirma que el promotor nuevo que comprende pDAB105743 (*Z. luxurians* v1), como se describe en al presente solicitud, conduce la expresión alta de la proteína *PhiYFP* en el polen.

Ejemplo 8: Construcción de vectores

Se muestra en la figura 12 una construcción de vectores de expresión binaria 12. La construcción pDAB112853 se compone del gen

reportero *PhiYFP* y la 3'-UTR *ZmPer5* que se estimularon mediante el promotor v2 de la *Ubi-1Zm*. La construcción pDAB112853 también se compone del gen *AAD-1* y la 3'-UTR v1 *ZmLip* que se estimularon mediante *Z. luxurians* v1.

La construcción pDAB112853 se creó usando metodología estándar tal como se describe en, por ejemplo, Ausubel *et ál.* (1995), y Sambrook *et ál.* (1989) y actualizaciones de estos. La transformación o expresión de vectores para la transformación de embriones del maíz mediado por *Agrobacterium* se construyó mediante el uso de métodos de clonación estándar y reacciones de recombinación Gateway® que emplean un vector binario de destino estándar y el vector de entrada que comprende los casetes de expresión génica, tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 9: Expresión vegetal estable de transgenes operativamente unidos a nuevos promotores

Las plantas completas que contenían una baja cantidad de copias (es decir, de 1 a 2 copias) del transgén *PhiYFP* se cultivaron en un invernadero. Se utilizaron diecinueve (19) eventos para el análisis de expresión T_0 como se muestra en la Tabla 9 (a continuación). Se obtuvo la expresión de la proteína *AAD1* fuerte a partir de todos los eventos analizados (véase la Tabla 9).

Las plantas copiadoras de transgenes únicos T_0 se retrocruzaron con las plantas de maíz B104 de tipo salvaje para obtener semillas T_1 . Se utilizaron plantas T_1 hemicigotas para realizar el análisis. Se analizaron tres (3) eventos por construcción y cinco (5) por evento para la expresión de hojas R3. Se utilizaron tres (3) eventos por evento para otra expresión de tipos de tejidos.

Se muestran en la Tabla 10 (a continuación) mediciones cuantitativas de la proteína *AAD1* obtenida del tejido de la hoja de las plantas transgénicas T_1 que comprenden construcciones de promotores nuevos. Los datos de la Tabla 10 confirmaron los resultados de expresión de la hoja T_0 (véase la Tabla 9) y

mostraron además expresión alta de forma consistente de la proteína *AAD1* en la hoja R3 y otros tejidos que se obtuvieron de las plantas que contienen los promotores nuevos que se describen en la presente.

Tabla 9: Expresión de la proteína <i>AAD1</i> en la hoja		
#	Evento	Proteína <i>AAD1</i> (ng/cm2)
1	112853[1]-001.001	45,7
2	112853[1]-006.001	42,4
3	112853[1]-007.001	34,9
4	112853[1]-008.001	47,9
5	112853[1]-009.001	62,0
6	112853[1]-010.001	168,9
7	112853[1]-012.001	142,7
8	112853[1]-013.001	127,0
9	112853[1]-014.001	26,5
10	112853[1]-015.001	59,3
11	112853[2]-016.001	49,3
12	112853[2]-019.001	80,5
13	112853[2]-020.001	68,9
14	112853[2]-022.001	40,3
15	112853[2]-025.001	62,9
16	112853[2]-027.001	50,5
17	112853[2]-028.001	76,3
18	112853[2]-029.001	55,8
19	112853[2]-030.001	72,5

Tabla 10: Expresión de la proteína <i>AAD1</i> en diferentes tipos de tejidos de las plantas T ₁								
Evento	Media <i>AAD-1</i> (ng/mg)							
	Mazorca	Chala	Grano	Polen	Hoja R3	Raíz	Barba	Tallo
112853[1]-	2004,3	769,1	689,7	1134,9	824,7	1731,7	1765,5	2851,3

001								
112853[2] - 019	1542,8	672,4	896,6	859,8	776,9	2078,0	2174,5	3551,4
112853[2] - 020	1725,7	1015,5	625,9	591,2	556,0	1738,0	2203,7	2838,7

REIVINDICACIONES

Se reivindica lo siguiente:

1. Un casete de expresión génica que comprende un promotor operativamente unido a un transgén, donde el promotor comprende un polinucleótido con una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO: 2.
2. El casete de expresión génica de la reivindicación 1, donde el promotor hibrida en condiciones de rigurosidad 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, donde el transgén unido operativamente 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 un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN y un transgén marcador seleccionable.
5. El casete de expresión génica de la reivindicación 1, que comprende además una región no traducida 3'.
6. Un vector recombinante que comprende el casete de expresión génica de la reivindicación 1.
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.
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 célula transgénica es una célula vegetal transgénica.

10. Una planta transgénica que comprende la célula vegetal transgénica de la reivindicación 9.
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 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 de la 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. 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 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.
17. La célula transgénica de la reivindicación 16, donde la célula vegetal transgénica se produce mediante un método de transformación vegetal.
18. La célula transgénica de la reivindicación 17, donde el método de transformación vegetal se selecciona del grupo que consiste en un método de transformación mediada con *Agrobacterium*, un método de transformación biolística, un método de transformación de carburo de silicio, un método de transformación de protoplasto, un método de transformación de liposomas.
19. Una planta transgénica que comprende la célula vegetal transgénica de la reivindicación 14.
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 consiste en una planta de maíz, una planta de arroz y una planta de trigo.
22. Una semilla transgénica 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 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 de codificación heteróloga en una planta transgénica, el método que 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 operativamente unida a la secuencia de codificación heteróloga, que está operativamente unida a una región no traducida 3'.
 - b) aislar la célula vegetal transformada que comprende el casete de expresión génica;
 - c) regenerar la célula vegetal transformada en una planta transgénica; y
 - 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.
26. El método de la reivindicación 25, donde la secuencia de codificación heteróloga se selecciona del grupo que consiste en un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, una secuencia de codificación de enlace al ADN y una secuencia de codificación del marcador seleccionable.
27. El método de la reivindicación 25, donde la transformación de 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 en un método de transformación mediada con *Agrobacterium*, un método de transformación 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 monocotiledónea o dicotiledónea.
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.
31. Una semilla transgénica de la planta transgénica de la reivindicación 25.
32. El método de la reivindicación 25, donde la secuencia de codificación heteróloga se expresa en un tejido vegetal transgénico.
33. El método de la reivindicación 25, donde el tejido vegetal transgénico es una raíz, brote, tallo o tejido de polen vegetal transgénico.
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 que comprende:
 - a) identificar una secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO;
 - b) producir una multiplicidad de secuencias de cebadores de oligonucleótidos, donde las secuencias de cebadores de oligonucleótidos se unen a la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID;
 - c) aumentar la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID de la muestra de ADN con las secuencias de cebadores de oligonucleótidos seleccionados a partir de una

multiplicidad de secuencias de cebadores de oligonucleótidos; y

d) aislar la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO.

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 NO: 2 está operativamente unida a un transgén.
36. El método de la reivindicación 35, donde el transgén operativamente unido codifica un polipéptido o ARN pequeño.
37. Una secuencia de polinucleótido 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.
38. La secuencia de polinucleótido purificada de la reivindicación 37, donde una secuencia de sonda de polinucleótido que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto al complemento de la SEQ ID NO: 2 se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de polinucleótido purificada de la reivindicación 37.
39. La secuencia de polinucleótido purificada de la reivindicación 37, donde la secuencia de polinucleótido purificada está operativamente unida a un transgén.
40. El transgén operativamente unido de la reivindicación 39, donde el transgén unido operativamente codifica un polipéptido.
41. Un casete de expresión génica que comprende la secuencia de polinucleótido purificada operativamente unida al transgén de la reivindicación 37, que está operativamente unida a la región no traducida 3'.
42. El casete de expresión génica de la reivindicación 41, donde el transgén se selecciona del grupo que consiste en un transgén resistente a los insecticidas, un transgén con tolerancia a los herbicidas, un transgén eficaz en el uso de nitrógeno, un transgén

eficaz en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN y un transgén del marcador seleccionable.

43. Un vector recombinante que comprende el casete de expresión génica de la reivindicación 41.
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.
45. Una célula transgénica que comprende la secuencia de polinucleótidos purificados de la reivindicación 37.
46. La célula transgénica de la reivindicación 45, donde la célula transgénica es una célula vegetal transgénica.
47. Una planta transgénica que comprende la célula vegetal transgénica de la reivindicación 46.
48. La planta transgénica de la reivindicación 47, donde 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 planta de arroz.
50. Una semilla transgénica de la planta transgénica de la reivindicación 49.

Buenos Aires, Diciembre 2014, p.p. de DOW AGROSCIENCES LLC

Brígida Verónica Kapovic

Agente N° 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. 61/922,529; 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.: 61/922,529
DAS No.: 75665-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.

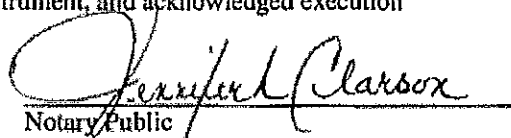


Sandeep Kumar

Date: 10/23/14

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

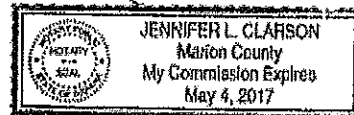
Manju Gupta
Manju Gupta

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

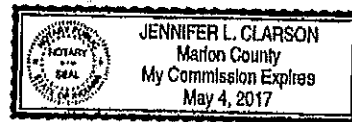
Terry R. Wright

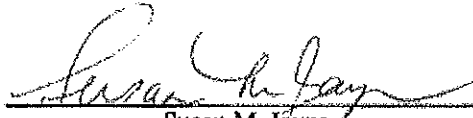
Date: 10/21/2014

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. Clarson
Notary Public

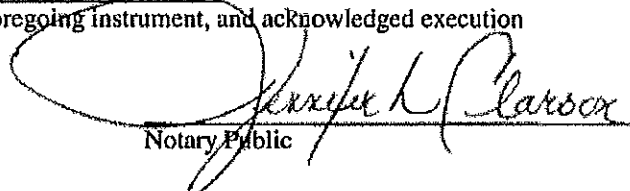



Susan M. Jayne

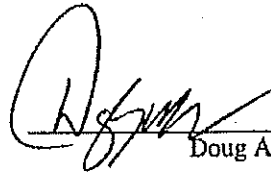
Date: 10/22/14

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



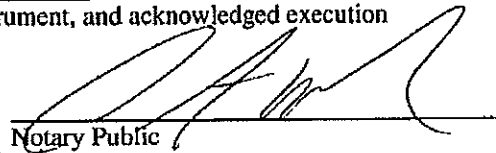
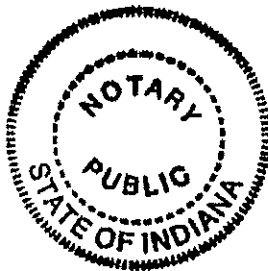


Doug A. Smith

Date: 11/13/14

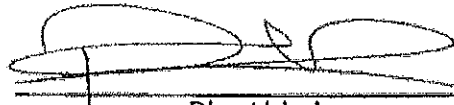
United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Hamilton)

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 Hamilton County, Indiana
my Commission expires 9/11/15

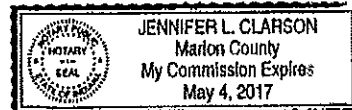

Diaa Alabed

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



CESIÓN DE INVENTORES

LA PRESENTE CESIÓN, efectiva este día 31 de diciembre de 2013 por Sandeep Kumar; Manju Gupta; Terry R. Wright; Susan M. Jayne; Doug A. Smith; y Diaa Alabed (en adelante conocidos como Cedentes), domiciliados 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 **PROMOTORES NOVEDOSOS DE UBIQUITINA DE MAÍZ**, establecidas en una solicitud provisional para Títulos Patente de los Estados Unidos, ya presentadas el 31 de diciembre de 2013 como la solicitud de EE.UU. No. 61/922,529; y

CONSIDERANDO QUE, Dow AgroScience LLC, una sociedad de responsabilidad limitada constituida bajo y conforme a las leyes del Estado 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 traspasado, y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan 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 para Títulos 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 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, reexaminaciones 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 a dichas invenciones y solicitud de Títulos 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 cualquiera de los Títulos Patente y solicitudes para Títulos 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 a dichas invenciones, o dicha solicitud Provisional de Títulos Patente, o cualquier procedimiento relacionado a cualquier Título Patente o solicitudes para Títulos 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 para Títulos Patente, o cualquier reemisión, reexaminación o extensión de cualquier 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 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 04 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 04 de mayo de 2017

(firma ilegible)

Terry R. Wright

Fecha: 21/10/2014

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

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 04 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 04 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

Residente del Condado de Hamilton, Indiana

Mi nombramiento vence el [fecha ilegible]

Sello: Notario Público
Estado de Indiana

(firma ilegible)

Diaa Alabed

Fecha: 23/10/2014

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

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 04 de mayo de 2017

HRN\HRN\ID-454317\WPC10975

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª Nº 72-35

BOGOTÁ, D. C. 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 12 de 352 352 y por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 632; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª Nº 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 Cónsul 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

and do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 632; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª Nº 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
WFFODERE-21 (MINUTA Nº 12.1.29.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 those 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



E. S. D.

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,

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
T.P.A. No. 23.555 del C.S. de la J
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

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"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 85 - Tel: (57-1) 347 3611 - Fax: (57-1) 211 8650 - Fax In U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - 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

<120> NUEVOS PROMOTORES DE LA UBIQUITINA DE MAÍZ

<130> DAS-75665

<140>

<141>

<150> 61/922,529

<151> 2013-12-31

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1993

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 1

gtgcagcgtg acccggtcgt gcccctctct agagataatg agcattgcat gtctaagtta
60

taaaaaatta ccacatattt tttttgtcac acttgtttga agtgcagttt atctatcttt
120

atacatatat ttaaacttta ctctacgaat aatataatct atagtactac aataatatca
180

gtgtttttaga gaatcatata aatgaacagt tagacatggt ctaaaggaca attgagtatt
240

ttgacaacag gactctacag ttttatcttt ttagtggtgca tgtgttctcc ttttttttg
300

caaatagctt cacctatata atacttcac ctttttatta gtacatccat ttagggttta
360

gggttaatgg tttttataga ctaatTTTT tagtacatct attttattct attttagcct
420

ctaaattaag aaaactaaaa ctctatttta gtttttttat ttaatagttt agatataaaa
480

tagaataaaa taaagtgact aaaaattaaa caaataccct ttaagaaatt aaaaaacta
540

aggaaacatt tttcttgttt cgagtagata atgccagcct gttaaagcc gtcgacgagt
600

ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcagc gtcgctcgg gccaaagcaa gcagacggca
660

cgcatctct gtcgctgcct ctggaccct ctcgagagtt ccgctccacc gttggacttg
720

ctccgctgtc ggcatccaga aattgcgtgg cggagcggca gacgtgagcc ggcacggcag
780

gcggcctcct cctcctctca cggcaccggc agctacgggg gattcctttc ccaccgctcc
840

ttcgctttcc cttcctcgcc cgccgtaata aatagacacc ccctccacac cctctttccc
900

caacctcgtg ttgttcggag cgcacacaca cacaaccaga tctccccaa atccaccggt
960

cggcacctcc gttcaaggt acgccgctcg tcctcccccc cccccccct ctctaccttc
1020

tctagatcgg cgttccggtc catgcatggt tagggcccgg tagttctact tctgttcatg
1080

tttgtgtag atccgtgttt gtgtagatc cgtgctgcta gcgttcgtac acggatgcga
1140

cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa cttgccagtg tttctctttg gggaatcctg
1200

ggatggctct agccgttccg cagacgggat cgatttcatg attttttttg tttcgttgca
1260

tagggtttgg tttgcccttt tcctttatatt caatatatgc cgtgcacttg tttgtcgggt
1320

catcttttca tgcttttttt tgtcttggtt gtgatgatgt ggtctggttg ggcggtcggt
1380

ctagatcggg gtagaattct gtttcaaact acctgggtgga tttattaatt ttggatctgt
1440

atgtgtgtgc catacatatt catagttacg aattgaagat gatggatgga aatatcgatc
1500

taggataggt atacatgttg atgcgggttt tactgatgca tatacagaga tgctttttgt
1560

tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggttg ggcggtcggt cattcgttct agatcggagt
1620

agaatactgt ttcaaactac ctggtgtatt tattaatttt ggaactgtat gtgtgtgtca
1680

tacatcttca tagttacgag ttttaagatgg atggaaatat cgatctagga taggtataca
1740

tgttgatgtg ggttttactg atgcatatac atgatggcat atgcagcatc tattcatatg
1800

ctctaacctt gagtacctat ctattataat aaacaagtat gttttataat tatttcgatc
1860

ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt ggattttttt agccctgcct
1920

tcatacgcta tttatttgct tggtagtgtt tcttttgtcg atgctcaccg tgttgtttgg
1980

tgttacttct gca
1993

<210> 2
<211> 1900
<212> ADN
<213> Zea luxurians

<400> 2
gacccggtcg tgcccctctc tagagataaa gagcattgca tgtctaaggt atcaaaaatt
60

accacatatt tttttggcac acttatttaa agtgcagttt atctatctct atacacatat
120

ttaaacttca ctttataaat aatatagttt atagtactaa actaatatca gtgttttaga
180

taattatata aatgaaccgc tagacatggt ctaaagtaca accgagtatt tgacaacagg
240

actctacagt tttatctttt tagtgtgcat gtgttctctc tgtttttttt tttcaaatag
300

cttgacctat ataatacttc atccatttta ttagtacatc cattagggat tcaggggttga
360

tggtttctat agactaattt tttagtacat ctattttatt atttttaatt tttaaattaa
 420
 gaaaactgaa actctatfff agttactaca aattaaacaa atacccfiff aggaattaaa
 480
 aaaactaagg aaacattfff cttgtttcga gtagattatg acagcctgtt caacgccgtc
 540
 gacgagtcta acggacacca accagcgaac cagcagcgtc gcgtcgggcc aagcgaagca
 600
 gacggcacgg catctctgtc gctgcctctg gacccctctc gagagttccg ctccaccgtt
 660
 ggacttgctc cgctgtcggc atccagaaag tgcgtggcgg agcggcagac gtgaggcggc
 720
 ctctcctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggattc ctttcccacc gtccttcgc
 780
 tttcccttcc tcgcccgcg taataaatag acacccctc cacaccctct tttcccaacc
 840
 tcgtgtttgt tcggagcgca cacacacaca accagatctc ccccaaatcc acccgtcggc
 900
 acctccgctt caaggtacgc cgctcatcct cccccccct ctctacctc tctagatcgg
 960
 caatccggtc catggttagg gccgatagt tctacttctg ttcatgtttg tgtagatcc
 1020
 gtgctgctag cgttcgtaca cggatgcgac ctgtacatca gacacgttct gattgctaac
 1080
 ttgccagtgt ttctctttgg cgaatccagg gatggctcta gccgttcgc agacgggttc
 1140
 gatttcatga ttttttttgt ttcgttgcac atagggtttg gtttgccctt ttctttatt
 1200
 tccttatatg ctgtacactc tttgtcgggt catcttgtca tgcttctttt aatcttggtt
 1260
 gtgatgatgt gctctggttg ggcggtcgtt ctagatcgga gtagaatact gtttcaagct
 1320
 acctggtgga tttattaatt ttgtatctgt acgtgtgtgc catacatctt catagttacg
 1380
 agtttaagat gatggatgga aatatcgatc taggataggt atacatgttg atgcgggttt
 1440
 tactgatgca tatacagaga tgcttttttt tcgcttggtt gtgatgatgc ggtctggttg
 1500
 ggcggtcgtt ctagatcgga gtagaatact gtttcaaact acctggtgga tttattaatt
 1560
 ctggatctgt atgtgtgtgc catacatctt gatagttacg agtttaagat gatggatgga
 1620
 aatatcgatc taggataggt atacatgtcg atgtgggttt tactgatgca tatacatgat
 1680
 ggcatatgca gcatctattc atatgctcta accttgagta cctatctatt ataataaaca
 1740
 agtatgtttt ataattattt tgacctgat atacttggat gatggcatat gcagcagcta
 1800
 tatgtggatt tttttagcct tgccttcata cgctatttat ttgtttgggg ctgtttcttt
 1860

ttgttgacgc tcaccctggt gtttggtggt acttctgcag
1900

<210> 3
<211> 896
<212> ADN
<213> Zea mays

<400> 3
gtgcagcgtg acccggtcgt gcccctctct agagataatg agcattgcat gtctaagtta
60

taaaaaatta ccacatattt tttttgtcac acttgtttga agtgcagttt atctatcttt
120

atacatatat ttaaacttta ctctacgaat aatataatct atagtactac aataatatca
180

gtgtttttaga gaatcatata aatgaacagt tagacatggt ctaaaggaca attgagtatt
240

ttgacaacag gactctacag ttttatcttt ttagtggtgca tgtgttctcc tttttttttg
300

caaatagctt cacctatata atacttcac ctttttatta gtacatccat ttagggttta
360

gggttaatgg tttttataga ctaatTTTT tagtacatct attttattct attttagcct
420

ctaaattaag aaaactaaaa ctctatTTTA gtttttttat ttaatagttt agatataaaa
480

tagaataaaa taaagtgact aaaaattaaa caaataccct ttaagaaatt aaaaaaacta
540

aggaaacatt tttcttgttt cgagtagata atgccagcct gttaaacgcc gtcgacgagt
600

ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcagc gtcgctcgg gccaaacgaa gcagacggca
660

cggcatctct gtcgctgcct ctggaccct ctcgagagtt ccgctccacc gttggacttg
720

ctccgctgtc ggcatccaga aattgcgtgg cggagcggca gacgtgagcc ggcacggcag
780

gcggcctcct cctcctctca cggcaccggc agctacgggg gattcctttc ccaccgtcc
840

ttcgctttcc cttcctcgcc cgccgtaata aatagacacc ccctccacac cctctt
896

<210> 4
<211> 831
<212> ADN
<213> Zea luxurians

<400> 4
gacccggtcg tgcccctctc tagagataaa gagcattgca tgtctaaggt atcaaaaatt
60

accacatatt tttttggcac acttatttaa agtgcagttt atctatctct atacacatat
120

ttaaacttca ctttataaat aatatagttt atagtactaa actaatatca gtgtttttaga
180

taattatata aatgaaccgc tagacatggt ctaaagtaca accgagtatt tgacaacagg
240

actctacagt tttatctttt tagtgtgcat gtgttctctc tgtttttttt tttcaaatag
300
cttgacctat ataatacttc atccatttta ttagtacatc cattagggat tcagggttga
360
tggtttctat agactaattt tttagtacat ctattttatt atttttaatt tttaaattaa
420
gaaaactgaa actctatttt agttactaca aattaaacaa ataccttta aggaattaa
480
aaaactaagg aaacattttt ctgttttcga gtagattatg acagcctgtt caacgccgtc
540
gacgagtcta acggacacca accagcgaac cagcagcgtc gcgtcgggcc aagcgaagca
600
gacggcacgg catctctgtc gctgcctctg gacccctctc gagagttccg ctccaccgtt
660
ggacttgctc cgctgtcggc atccagaaag tgcgtggcgg agcggcagac gtgaggcggc
720
ctcctcctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggattc ctttcccacc gtccttcgc
780
tttcccttcc tcgcccgcg taataaatag acacccctc cacaccctt t
831

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

<400> 5
tccccaacct cgtgttggtc ggagcgcaca cacacacaac cagatctccc ccaaattcac
60
ccgtcggcac ctccgcttca ag
82

<210> 6
<211> 83
<212> ADN
<213> Zea luxurians

<400> 6
tccccaacct cgtgttggtt cggagcgcac acacacacaa ccagatctcc cccaaatcca
60
cccgtcggca cctccgcttc aag
83

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

<400> 7
gtacgccgt cgtcctcccc ccccccccc ctctctacct tctctagatc ggcgttcgg
60
tccatgcatg gttagggccc ggtagttcta cttctgttca tgtttgtgtt agatccgtgt
120
ttgtgttaga tccgtgtgc tagcgttcgt acacggatgc gacctgtacg tcagacacgt
180
tctgattgct aacttgccag tgtttctctt tggggaatcc tgggatggct ctagccgttc
240

cgcagacggg atcgatttca tgatTTTTTT tgtttcgttg catagggttt ggtttgcct
300

tttcctttat ttcaatatat gccgtgcact tgtttgtcgg gtcactttt catgctttt
360

tttgtcttgg ttgtgatgat gtggtctggt tgggcggtcg ttctagatcg gagtagaatt
420

ctgtttcaaa ctacctggtg gatttattaa ttttggatct gtatgtgtgt gccatacata
480

ttcatagtta cgaattgaag atgatggatg gaaatatcga tctaggatag gtatacatgt
540

tgatgcgggt tttactgatg catatacaga gatgctttt gttcgcttgg ttgtgatgat
600

gtggtgtggt tgggcggtcg ttcatcgtt ctagatcgga gtagaatact gtttcaaact
660

acctggtgta tttattaatt ttggaactgt atgtgtgtgt catacatctt catagttagc
720

agttaaagat ggatggaaat atcgatctag gataggata catgttgatg tgggttttac
780

tgatgcatat acatgatggc atatgcagca tctattcata tgctctaacc ttgagtacct
840

atctattata ataaacaagt atgttttata attatttcga tcttgatata cttggatgat
900

ggcatatgca gcagctatat gtggattttt ttagccctgc cttcatacgc tatttatttg
960

cttgggtactg tttcttttgt cgatgtcac cctgttgttt ggtgttactt ctgca
1015

<210> 8
<211> 986
<212> ADN
<213> Zea luxurians

<400> 8
gtacgccgt catcctcccc cccctctct accttctcta gatcggcaat ccggtccatg
60

gttagggccc gatagttcta cttctgttca tgtttgtgtt agatccgtgc tgctagcgtt
120

cgtacacgga tgcgacctgt acatcagaca cgttctgatt gctaacttgc cagtgtttct
180

ctttggcgaa tccagggatg gctctagccg ttccgcagac gggttcgatt tcatgatttt
240

ttttgtttcg ttgcacatag ggtttggtt gcccttttcc tttatttcct tatatgctgt
300

acactctttg tcgggtcatc ttgtcatgct tcttttaatc ttggttgatga tgatgtgctc
360

tggttgggcg gtcgttctag atcggagtag aatactgttt caagctacct ggtggattta
420

ttaattttgt atctgtacgt gtgtgccata catcttcata gttacgagtt taagatgatg
480

gatggaaata tcgatctagg ataggtatac atgttgatgc gggttttact gatgcatata
540

cagagatgct tttttttcgc ttggttgatga tgatgcggtc tggttgggcg gtcgttctag
600

atcggagtag aatactgttt caaactacct ggtggattta ttaattctgg atctgtatgt
660

gtgtgccata catcttgata gttacgagtt taagatgatg gatggaaata tcgatctagg
720

ataggatac atgtcgatgt gggttttact gatgcatata catgatggca tatgcagcat
780

ctattcatat gctctaacct tgagtaccta tctattataa taaacaagta tgttttataa
840

ttattttgac ctgatatac ttggatgatg gcatatgcag cagctatatg tggatttttt
900

tagccttgcc ttcatacgct atttatttgt ttggggctgt ttctttttgt tgacgctcac
960

cctgttgttt ggtgttactt ctgcag
986

<210> 9
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 9
gctaccgcgg acccggtcgt gccctctct agagataatg
40

<210> 10
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 10
agtcaggtag cctgcagaag taacaccaa caacag
36

<210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 11
cgtgttgga agaacttg a
21

<210> 12
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: cebador
sintético

<400> 12

ccgtggttgg cttggtct
18

<210> 13
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<223> 5'FAM

<400> 13
cactccccac tgcct
15

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

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

<400> 14
tggcggacga cgacttgt
18

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

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

<400> 15
aaagtttgga ggctgccgt
19

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

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda
sintética

<220>
<223> 5'HEX

<400> 16
cgagcagacc gccgtgtact t
21

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

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

<400> 17
acaagagtgg attgatgatc tagagaggt
29

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

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

<400> 18
ctttgatgcc tatgtgacac gtaaacagt
29

<210> 19
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<223> 5'FAM

<400> 19
ggtgttgagg ctggtattgc ttacgctgg
29

RESUMEN

El promotor de la Ubiquitina-1 B73 de *Zea mays* c.v. (Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v.) lleva altos niveles de expresión transgénica constitutiva a las plantas. El uso repetido del promotor de la Ubi-1 B73 de *Z. mays* c.v. en construcciones de múltiples genes puede también conducir al silenciamiento génico, elaborando así productos transgénicos menos eficaces. Se proporcionan elementos del promotor regulador génico, construcciones y métodos para expresar un transgén en células vegetales y/o tejidos vegetales usando elementos reguladores génicos del promotor de la Ubi-1 de una *Zea* especie, *Z. luxurians* v1 diferente.

FIG. 12

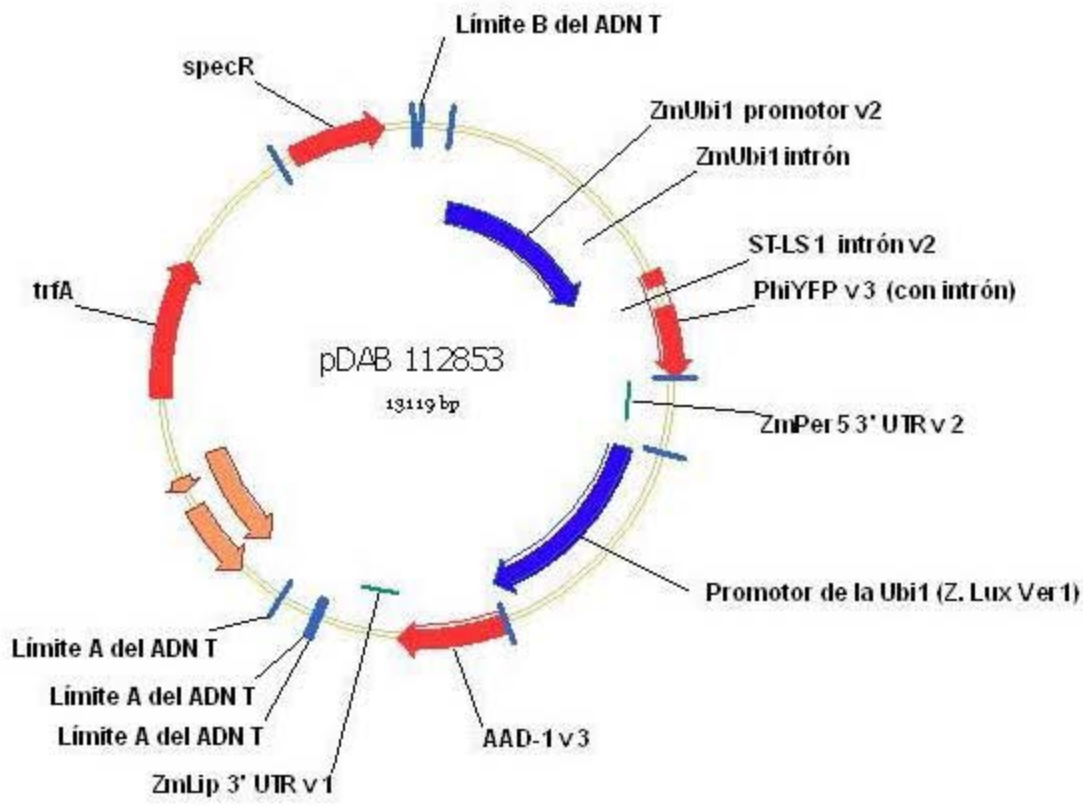


FIG. 10

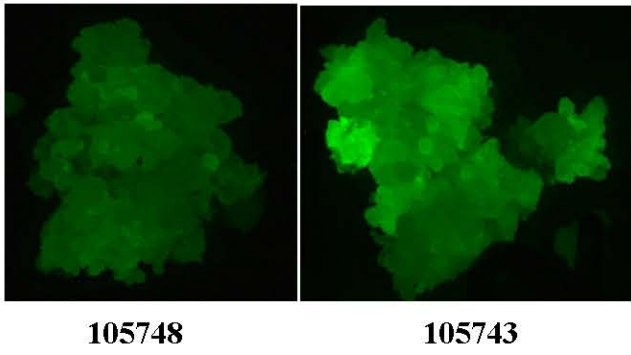


FIG. 11

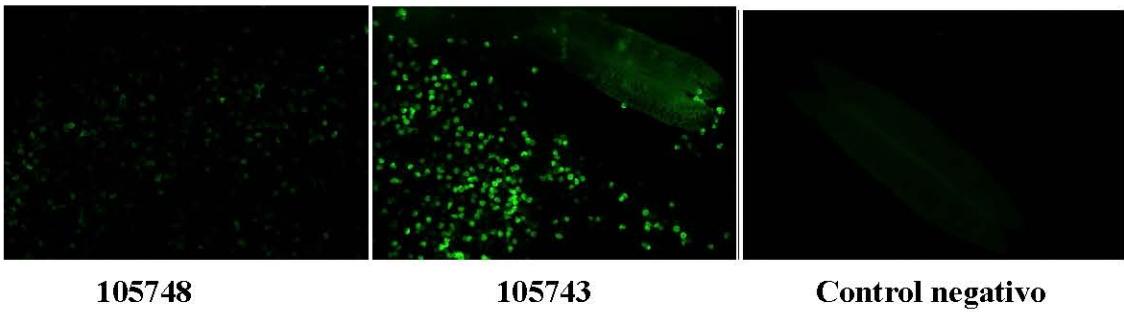


FIG. 8

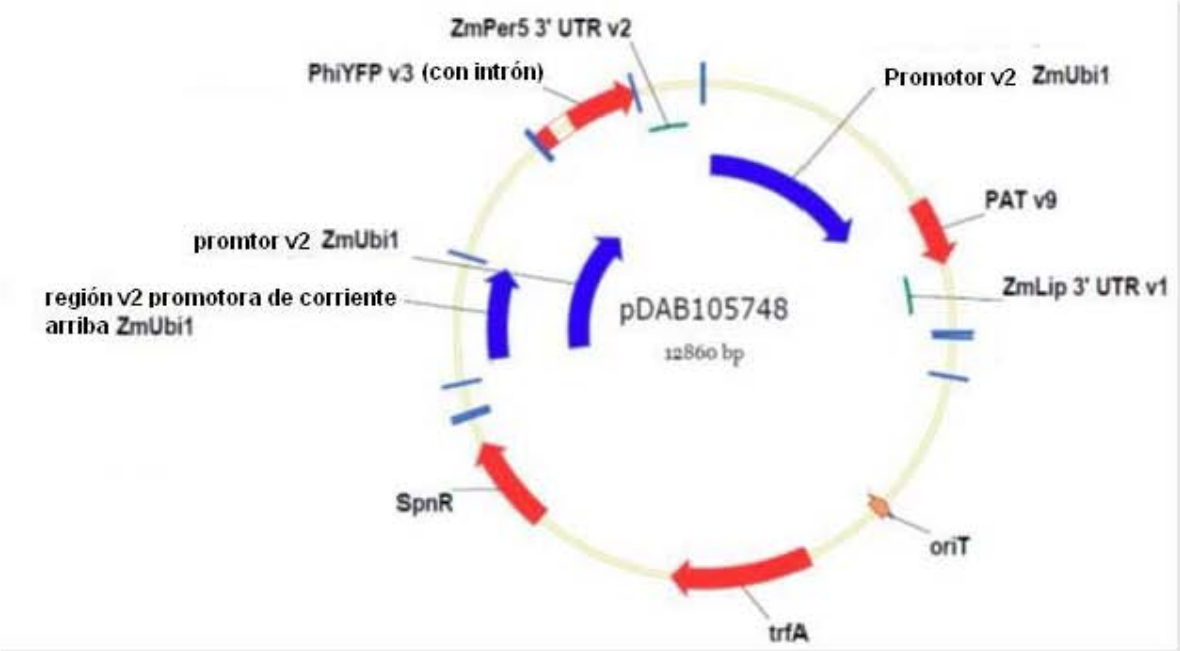
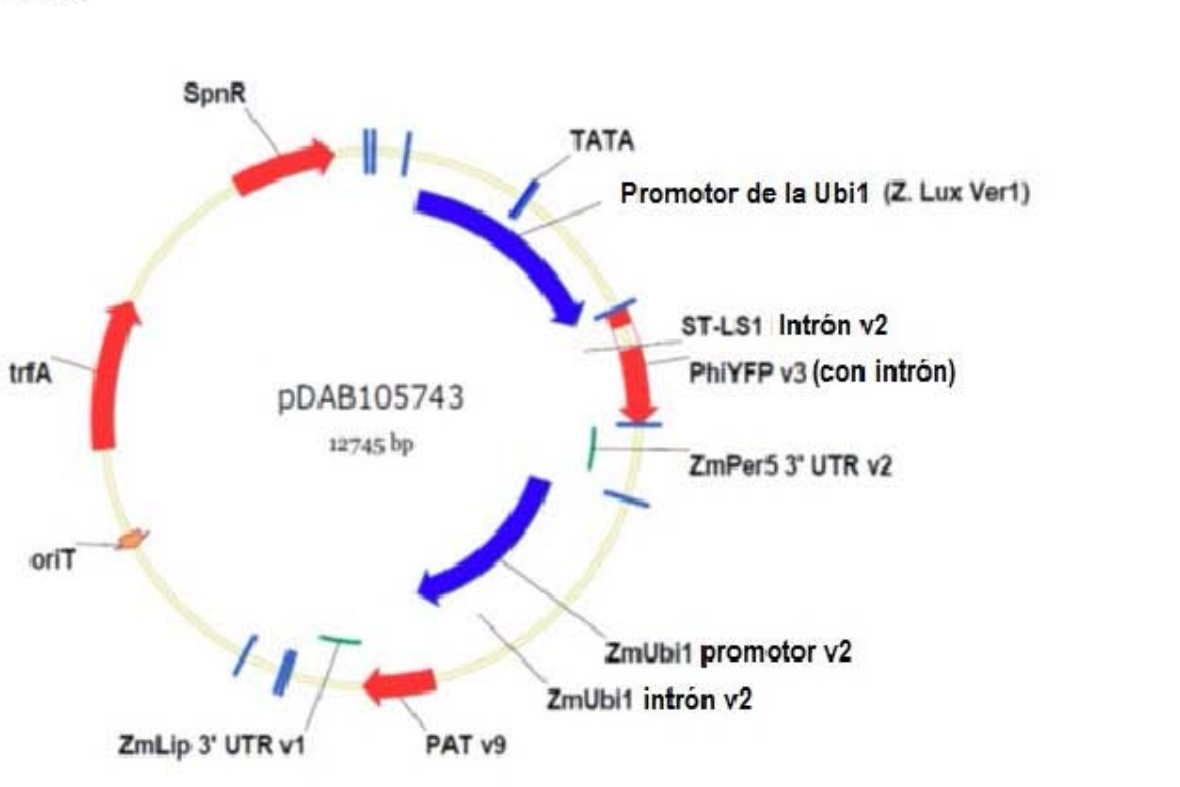


FIG. 9



		631	665
Z. luxurians v1 intrón	(598)	---TAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACC	
Z. mays c.v. B73 intrón	(629)	<u>TTC</u> TAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACC	
		666	700
Z. luxurians v1 intrón	(630)	TGGTGGATTATTATAATTCTGGATCTGTATGTGTGT	
Z. mays c.v. B73 intrón	(664)	TGGTGTATTATTATAATTTGGAACTGTATGTGTGT	
		701	735
Z. luxurians v1 intrón	(665)	GCCATACATCTTGATAGTTACGAGTTTAAGATGAT	
Z. mays c.v. B73 intrón	(699)	GT <u>CATACATCTT</u> CATAGTTACGAGTTTAAGATG--	
		736	770
Z. luxurians v1 intrón	(700)	GGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT	
Z. mays c.v. B73 intrón	(732)	-GATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT	
		771	805
Z. luxurians v1 intrón	(735)	CGATGTGGGTTTTACTGATGCATATACATGATGGC	
Z. mays c.v. B73 intrón	(766)	TGATGTGGGTTTTACTGATGCATATACATGATGGC	
		806	840
Z. luxurians v1 intrón	(770)	ATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAG	
Z. mays c.v. B73 intrón	(801)	ATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAG	
		841	875
Z. luxurians v1 intrón	(805)	TACCTATCTATTATAATAAAACAAGTATGTTTTATA	
Z. mays c.v. B73 intrón	(836)	TACCTATCTATTATAATAAAACAAGTATGTTTTATA	
		876	910
Z. luxurians v1 intrón	(840)	ATTATTTTGACCTTGATATACTTGGATGATGGCAT	
Z. mays c.v. B73 intrón	(871)	ATTATTT <u>CGAT</u> CTTGATATACTTGGATGATGGCAT	
		911	945
Z. luxurians v1 intrón	(875)	ATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTAGCCTTGC	
Z. mays c.v. B73 intrón	(906)	ATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTAGCCTTGC	
		946	980
Z. luxurians v1 intrón	(910)	CTTCATACGCTATTTATTTGTTTGGGGCTGTTTCT	
Z. mays c.v. B73 intrón	(941)	CTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCT	
		981	1015
Z. luxurians v1 intrón	(945)	TTTTGTTGACGCTCACCCCTGTTGTTTGGTGTTACT	
Z. mays c.v. B73 intrón	(976)	TTT-GT <u>CGAT</u> GTCTCACCCCTGTTGTTTGGTGTTACT	
		1016	
Z. luxurians v1 intrón	(980)	TCTGCA	
Z. mays c.v. B73 intrón	(1010)	TCTGCA-	

FIG. 7

		1	35
Z. luxurians v1 intrón	(1)	GTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCC-----TCTC	
Z. mays c.v. B73 intrón	(1)	GTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCCTCTC	
		36	70
Z. luxurians v1 intrón	(30)	TACCTTCTCTAGATCGGCAAATCCGGTCCATG----	
Z. mays c.v. B73 intrón	(36)	TACCTTCTCTAGATCGGCGTTCGGTCCATGCATG	
		71	105
Z. luxurians v1 intrón	(61)	GTTAGGGCCCCGATAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTT	
Z. mays c.v. B73 intrón	(71)	GTTAGGGCCCCGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTT	
		106	140
Z. luxurians v1 intrón	(96)	GTGTTAGATCCGTG-----CTGC	
Z. mays c.v. B73 intrón	(106)	GTGTTAGATCCGTGTTTGTTAGATCCGTGCTGC	
		141	175
Z. luxurians v1 intrón	(114)	TAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACATCAGA	
Z. mays c.v. B73 intrón	(141)	TAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGA	
		176	210
Z. luxurians v1 intrón	(149)	CACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTT	
Z. mays c.v. B73 intrón	(176)	CACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTT	
		211	245
Z. luxurians v1 intrón	(184)	TGGCGAATCCAGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAG	
Z. mays c.v. B73 intrón	(211)	TGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAG	
		246	280
Z. luxurians v1 intrón	(219)	ACGGGTTCGATTTTCATGATTTTTTTTGTTCGTTG	
Z. mays c.v. B73 intrón	(246)	ACGGGATCGATTTTCATGATTTTTTTTGTTCGTTG	
		281	315
Z. luxurians v1 intrón	(254)	CACATAGGGTTTGGTTTGCCCTTTTCCTTTATTTTC	
Z. mays c.v. B73 intrón	(281)	CA--TAGGGTTTGGTTTGCCCTTTTCCTTTATTTTC	
		316	350
Z. luxurians v1 intrón	(289)	CTTATATGCTGTACACTC-TTTGTGCGGT CATCTT	
Z. mays c.v. B73 intrón	(314)	AAATATATGCCGTGCACTTGTTTGTGCGGT CATCTT	
		351	385
Z. luxurians v1 intrón	(323)	GTCATGCTTCTTTTAACTTTGGTTGTGATGATGTG	
Z. mays c.v. B73 intrón	(349)	TTTATGCTTCTTTTGTCTTTGGTTGTGATGATGTG	
		386	420
Z. luxurians v1 intrón	(358)	CTCTGGTTGGGCGGTGTTCTAGATCGGAGTAGAA	
Z. mays c.v. B73 intrón	(384)	GTCTGGTTGGGCGGTGTTCTAGATCGGAGTAGAA	
		421	455
Z. luxurians v1 intrón	(393)	TACTGTTTCAAGCTACCTGGTGGATTTATTAATTT	
Z. mays c.v. B73 intrón	(419)	TTCTGTTTCAAACTACCTGGTGGATTTATTAATTT	
		456	490
Z. luxurians v1 intrón	(428)	TGTATCTGTACGTGTGTGCCATACATCTTCATAGT	
Z. mays c.v. B73 intrón	(454)	TGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATATTTCATAGT	
		491	525
Z. luxurians v1 intrón	(463)	TACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCT	
Z. mays c.v. B73 intrón	(489)	TACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCT	
		526	560
Z. luxurians v1 intrón	(498)	AGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGA	
Z. mays c.v. B73 intrón	(524)	AGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGA	
		561	595
Z. luxurians v1 intrón	(533)	TGCATATACAGAGATGCTTTTTTTTTCGCTTGTTG	
Z. mays c.v. B73 intrón	(559)	TGCATATACAGAGATGCTTTTTTGTTTCGCTTGTTG	
		596	630
Z. luxurians v1 intrón	(568)	TGATGATGCGGTCTGGTTGGGCGGTGTTT-----	
Z. mays c.v. B73 intrón	(594)	TGATGATGTGGTGTGGTTGGGCGGTGTTTCATTTCG	

FIG. 6

			1		40
Z. luxurians v1 5'UTR	(1)	TCCCCAACCTCGTGTTT	GTT	CGGAGCGCACACACACACAA	
Z. mays c.v. B73 5'UTR	(1)	TCCCCAACCTCGTGTT	-	GTT	CGGAGCGCACACACACACAA
		41			80
Z. luxurians v1 5'UTR	(41)	CCAGATCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTC			
Z. mays c.v. B73 5'UTR	(40)	CCAGATCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTC			
		81			
Z. luxurians v1 5'UTR	(81)	AAG			
Z. mays c.v. B73 5'UTR	(80)	AAG			

		631	665
Z. mays c.v.B73 corriente arriba(627)		CAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCAC	
Z. luxurians v1 corriente arriba(574)		CAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCAC	
		666	700
Z. mays c.v.B73 corriente arriba(662)		GGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAG	
Z. luxurians v1 corriente arriba(609)		GGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAG	
		701	735
Z. mays c.v.B73 corriente arriba(697)		AGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCTG	
Z. luxurians v1 corriente arriba(644)		AGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCTG	
		736	770
Z. mays c.v.B73 corriente arriba(732)		GCATCCAGAAATGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTG	
Z. luxurians v1 corriente arriba(679)		GCATCCAGAAAGTGCCTGGCGGAGCGGCAGACGTG	
		771	805
Z. mays c.v.B73 corriente arriba(767)		AGCCGGCACGGGAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCAC	
Z. luxurians v1 corriente arriba(714)		AG-----GCGGCCTCCTCCTCCTCTCAC	
		806	840
Z. mays c.v.B73 corriente arriba(802)		GGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCTTTCCACCG	
Z. luxurians v1 corriente arriba(737)		GGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCTTTCCACCG	
		841	875
Z. mays c.v.B73 corriente arriba(837)		CTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAA	
Z. luxurians v1 corriente arriba(772)		CTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAA	
		876	900
Z. mays c.v.B73 corriente arriba(872)		ATAGACACCCCTCCACACCCCTCTT	
Z. luxurians v1 corriente arriba(807)		ATAGACACCCCTCCACACCCCTCTT	

FIG. 5

				1		35
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(1)	GTGCAGCGT	GACCCGGT	CGTGCCCTCTCTAGAGA
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(1)	-----	GACCCGGT	CGTGCCCTCTCTAGAGA
				36		70
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(36)	TAATT	GAGCATTGCATGTCTAAGT	TATAAAAAATTA
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(27)	TAAAG	GAGCATTGCATGTCTAAGT	TATCAAAAATTA
				71		105
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(71)	CCACATATTTTTTTT	TGT	CACACTTGTTTGAAGTGC
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(62)	CCACATATTTTTTTT	-GG	CACACTTATTTAAAGTGC
				106		140
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(106)	AGTTTATCTATCTT	TATACAT	TATATTAAACTTTA
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(96)	AGTTTATCTATCT	TATACA	CATATTAAACTTCA
				141		175
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(141)	CTCTAC	CGAATAATATAAT	CTATAGTACTACAATAA
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(131)	CTTTATA	AAATAATATAGT	TTATAGTACTAACTAA
				176		210
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(176)	TATCAGTGTTTTAGA	GAAAT	CATATAAATGAACAGT
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(166)	TATCAGTGTTTTAGA	TAAAT	TATATAAATGAACCGC
				211		245
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(211)	TAGACATGGTCTAAAG	GACAA	TTGAGTATTTTGAC
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(201)	TAGACATGGTCTAAAG	TACAA	CCGAGTATTT-GAC
				246		280
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(246)	AACAGGACTCTACAG	TTTTATCTTTTT	TAGTGTGCA
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(235)	AACAGGACTCTACAG	TTTTATCTTTTT	TAGTGTGCA
				281		315
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(281)	TGTGTTCTC	C----	TTTTTTTTTGCAAATAGCTTC
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(270)	TGTGTTCTC	TCTGT	TTTTTTTTTCAAATAGCTTG
				316		350
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(312)	ACCTATATAAATACT	TCATCCATTTT	TATTAGTACAT
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(305)	ACCTATATAAATACT	TCATCCATTTT	TATTAGTACAT
				351		385
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(347)	CCATT	TAGGGTTTAGGGTT	AATGGTTTCTATAGAC
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(340)	CCATT	TAGGGATT	CAGGGTTGATGGTTCTATAGAC
				386		420
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(382)	TAATTTTTTT	TAGTACATCTATTTT	TATTCTATTTTA
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(375)	TAATTTTTTT	-AGTACATCTATTTT	TATTAT-TTTTA
				421		455
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(417)	GCCCT	CTAAATTAAGAAAACT	AAAACTCTATTTTAG
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(408)	ATTTT	TAAATTAAGAAAACT	GAAACTCTATTTTAG
				456		490
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(452)	TTTTTTTATTTAA	T	AGTTTAGATATAAAATAGAA
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(443)	T-----	T-----	-----
				491		525
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(487)	AAAATAAAGTG	ACTA	AAAATTAACAAATACCCCTT
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(445)	-----	ACTA	CAAATTAACAAATACCCCTT
				526		560
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(522)	TAAGAAAT	TAAAAAACTAAGGAA	ACATTTTCTT
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(469)	TAAGGAAT	TAAAAAACTAAGGAA	ACATTTTCTT
				561		595
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(557)	GTTTCGAGTAGATA	AATGC	CAGCCTGTTAAACGCCG
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(504)	GTTTCGAGTAGATT	ATGA	CAGCCTGTTCAACGCCG
				596		630
Z. mays c.v.B73	corriente	arriba	(592)	TCGACGAGTCTAAC	GGACACCAACCAGCGA	ACCAG
Z. luxurians v1	corriente	arriba	(539)	TCGACGAGTCTAAC	GGACACCAACCAGCGA	ACCAG

FIG. 4

GACCCGGTCGTGCCCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAGGTATCA
AAAATTACCACATATTTTTTTTGGCACACTTATTTAAAGTGCAGTTTATCTATCTC
TATACACATATTTAAACTTCACTTTATAAATAATATAGTTTATAGTACTAAACT
AATATCAGTGTTTTAGATAATTATATAAATGAACCGCTAGACATGGTCTAAAGT
ACAACCGAGTATTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATG
TGTTCTCTCTGTTTTTTTTTTTCAAATAGCTTGACCTATATAATACTTTCATCCATT
TTATTAGTACATCCATTAGGGATTTCAGGGTTGATGGTTTCTATAGACTAATTTTT
TAGTACATCTATTTTATTATTTTTAATTTTTTAAATTAAGAAAACCTGAAACTCTAT
TTTAGTTACTACAAATTAACAAATACCCTTTAAGGAATTAAAAAACTAAGG
AAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATTATGACAGCCTGTTCAACGCCGTCGACG
AGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGA
AGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCG
CTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCCGCATCCAGAAAGTGCGTGGCGGAGC
GGCAGACGTGAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGG
ATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGA
CACCCCTCCACACCCTCTTTCCCCAACCTCGTGTTTGTTTCGGAGCGCACACAC
ACACAACCAGATCTCCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGgtacgcc
geteatectccccccccctctetacettctetagatcggeaatceggtecatggtagggcecgatagttctactctgttcatgtttgtgt
tagatecgtgctgctagegttcgtacacggatgcgacctgtacatcagacacgttctgattgctaaactgccagtgttctctttggcga
atccagggatggctctagccgttccgeagacgggttcgatttcatgattttttgttcgttcacatagggtttggttgcccttttccftt
atttcttatatgctgtacactctttgtcgggtcatcttgcatgcttctttaatcttggttgatgatgtgctctggttgggcggtcgttcta
gacggagtagaataactgtttcaagctacctgggtgattttaattttgtatctgtacgtgtgtgccatacatcttcatagttacgagttta
agatgatggatggaaatcgcgatctaggataggtatacatgttgatgcgggtttactgatgcatacacagagatgcttttttccgttgg
ttgtgatgatgcggctctggttggcggtcgttctagatcggagtagaataactgtttcaactacctgggtgattttaattctggatctgt
atgtgtgtgccatacatcttgatagttacgagtttaagatgatggatggaaatcgcgatctaggataggtatacatgtcgatgtgggtttt
actgatgcatacatgatggcatatgcagcatctattcatatgctctaacctgagtacctatctattataataaacaagtatgtttataat
tattttgaccttgatatacttggatgatggcatatgcagcagctatatgtggattttttagccttgccttcatacgctattttgtttgggg
ctgtttcttttgttgacgctcaccctgttgttgggtgttactctgcag

FIG. 3

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCT
AAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTTGTGCACACTTGTTTGAAGTGCAGTT
TATCTATCTTTATACATATATTTAAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAG
TACTACAATAATATCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATG
GTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTT
AGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCTATATAATACTTC
ATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTTTTTATAGACT
AATTTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATTAAGAAAACTA
AAACTCTATTTTAGTTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATATAAAATAGAATAAAAT
AAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAAACTAAGGA
AACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAACGCCGTCGACGA
GTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAA
GCAGACGGCACGGCATCTCTGTCTGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGC
TCCACCGTTGGACTIONGCTCCGCTGTCTGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGG
CAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCA
GCTACGGGGGATTCCCTTCCCACCGCTCCTTCGCTTTCCTTCCTCGCCCCGCCGT
AATAAATAGACACCCCTCCACACCCTCTTTCCCCAACCTCGTGTTGTTTCGGAG
CGCACACACACACAACCAGATCTCCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTT
CAAGgtacgecgctgctctccccccccccccctctctacettctctagategggcggtccgggtccatgcattggttagggcccg
gtagttctacttctgttcattgtttgtgtagatccgtgtttgtgtagatccgtgctgctagcgttcgtacacggatgegacctgtacgca
gacacgttctgattgctaactgccagtgttctcttggggaatcctgggatggctctagccgttcgcagacgggategatttcattga
ttttttgttctggtcatagggttgggttgccttttctttatttcaatatatgccgtgcacttgtttgctgggtcatctttcatgcttttttg
tcttggttgatgatgtggtctggttggcggtcgttctagateggagtagaattctgtttcaaaactacctgggtgatttattatgttga
tctgtatgtgtgccatacatattcatagttacgaattgaagatgatggatggaaatcgcattaggtataggtatacatgttgatgcgg
gtttactgatgcataacagatgcttttgttcgcttgggtgtgatgatgtggtgtggttggcggtcgttcattcgttctagatcgag
tagaatactgtttcaaaactacctgggtgatttattatgttgaactgtatgtgtgtgcatacatcttcatagttacgatttaagatggatg
gaaatcgcattaggtataggtatacatgttgatgtgggtttactgatgcatacatgatggcatatgcagcatctattcatatgctcta
acctgagtagctattataataaacaagatgtttataattattcagcttgcataactggatgatggcatatgcagcagctatatg
tggatttttttagccctgccttcatacgtatttatttgccttggtactgtttctttgtcgatgctaccctgttgttgggttacttctgca

FIG. 1

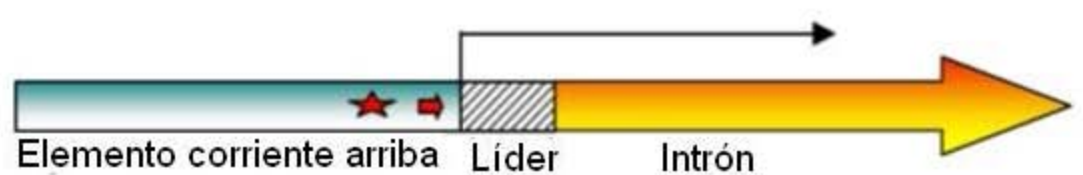


FIG. 2

