

PROMOTORES NOVEDOSOS DE UBIQUITINA DE MAÍZ

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio conforme al título 35 del USC [Código de Estados Unidos] § 119(e) de la solicitud provisional estadounidense con el número de serie 61/922,522, presentada el 31 de diciembre de 2013, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en términos generales al campo de la biología molecular vegetal y, de forma más específica, al campo de la expresión de transgenes en plantas.

ANTECEDENTES

Muchas especies vegetales tienen la capacidad de transformarse con transgenes para introducir rasgos o características agronómicamente deseables. Se desarrollan y/o modifican especies vegetales para que tengan rasgos deseables particulares. Generalmente, los rasgos deseables incluyen, por ejemplo, mejora de la calidad del valor nutricional, mayor rendimiento, suministro de resistencia a plagas o enfermedades, mayor tolerancia a sequías y estrés, mejores calidades hortícolas (p. ej., pigmentación y crecimiento), transmisión de resistencia a herbicidas, habilitación de la producción de materiales y/o compuestos útiles en la industria a partir de la planta y/o habilitación de la producción de productos farmacéuticos.

Las especies vegetales transgénicas que comprenden múltiples transgenes apilados en un único locus genómico se producen mediante tecnologías de transformación vegetal. Las tecnologías de transformación vegetal producen la introducción de un transgén en una célula vegetal, la recuperación de una planta transgénica fértil que contiene la copia integrada de forma estable del transgén en el genoma vegetal, y la posterior expresión transgénica mediante transcripción y traducción del genoma vegetal produce plantas transgénicas con fenotipos y rasgos deseables. No obstante, se desean mecanismos que permitan que la producción de especies vegetales transgénicas exprese de forma elevada transgenes múltiples modificados genéticamente como una pila de rasgos.

Del mismo modo, se desean mecanismos que permitan la expresión de un transgén dentro de tejidos u órganos particulares de la planta. Por ejemplo, la mayor resistencia de una planta a la infección por patógenos del suelo se puede lograr transformando el genoma vegetal con un gen de

resistencia a patógenos de forma que se exprese fuertemente la proteína de resistencia al patógeno dentro de las raíces de la planta. De forma alternativa, puede ser deseable expresar un transgén en tejidos vegetales que se encuentren en una fase de desarrollo o crecimiento particular como, por ejemplo la elongación o división celular.

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

COMPENDIO

En la presente se describen promotores, construcciones y métodos para expresar un transgén en células vegetales y/o tejidos vegetales. En una modalidad, la expresión de un transgén comprende el uso de un promotor. En una modalidad, un promotor comprende una secuencia de polinucleótidos. En una modalidad, una secuencia de polinucleótidos del promotor comprende un promotor corriente arriba, una región sin traducción 5' (5'-UTR) o secuencia líder y un intrón. En una modalidad, una secuencia de polinucleótidos del promotor comprende el gen de Ubiquitina-1 (Ubi-1). En una modalidad, una secuencia de polinucleótidos del promotor comprende el gen de Ubi-1 de *Zea mays* (*Z. mays*).

En una modalidad, una construcción incluye un casete de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos del promotor obtenida del gen de Ubi-1 de *Z. mays*. En una modalidad, la secuencia de polinucleótidos del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* comprende una región de promotor 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 obtenida del gen de Ubi-1 de *Z. mays* fusionada con un intrón 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 obtenida del gen de Ubi-1 de *Z. mays* fusionada con un intrón del gen que codifica la proteína fluorescente amarilla de la especie *Phialidium* (*PhiYFP*), seguida por una región sin traducción 3' (3'-UTR) del gen de peroxidasa 5 de *Z. mays*. (*ZmPer5*). La secuencia de polinucleótidos resultante comprende un elemento regulador génico del promotor novedoso.

En una modalidad, un casete de expresión génica incluye un elemento regulador del promotor génico unido de forma operativa a un transgén o 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.

En la presente se describen métodos para cultivar plantas que expresen un transgén usando elementos reguladores del promotor génico novedoso (p. ej., promotor corriente arriba, 5'-UTR e intrón). En la presente también se describen métodos para cultivar tejidos y células vegetales que expresan un transgén usando el elemento regulador del promotor génico novedoso. En una modalidad, los métodos tal como se describen en la presente incluyen expresión de genes constitutivos en hojas, raíces, callos y polen vegetales. En la presente también se describen métodos para purificar una secuencia de polinucleótidos que comprenden el elemento regulador del promotor génico novedoso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** muestra un promotor novedoso esquemático que comprende el gen de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. El promotor está compuesto por un elemento corriente arriba, una 5'-UTR o secuencia líder y un intrón. El elemento corriente arriba se encuentra corriente arriba 5' del sitio de inicio de la transcripción (TSS), indicado con la flecha larga. El elemento corriente arriba está compuesto por elementos reguladores, como una caja TATA, indicada con la flecha corta y un elemento de choque térmico, indicado con la estrella.

La **FIG. 2** muestra el mapa de plásmidos para el vector pDAB105712 que comprende la secuencia del promotor amplificada con PCR del gen de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73.

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

La **FIG. 4** muestra la secuencia de polinucleótidos del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2) con la región del promotor corriente arriba subrayada, la 5'-UTR/secuencia líder sombreada y la región del intrón en minúscula.

La **FIG. 5** muestra la alineación de la secuencia de polinucleótidos de las regiones del promotor corriente arriba de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 4) en comparación con la secuencia del promotor corriente arriba de control de *Z. mays* c.v. B73 (SEQ ID NO: 3).

La **FIG. 6** muestra la alineación de la secuencia de polinucleótidos de la 5'-UTR/regiones líder de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 6) en comparación con la secuencia de 5'UTR/líder de control de *Z. mays* c.v. B73 (SEQ ID NO: 5).

La **FIG. 7** muestra la alineación de la secuencia de polinucleótidos de las regiones de intrón de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 8) en comparación con la secuencia de intrón de control de *Z. mays* c.v. B73 (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, pDAB105745, que comprende el vector de entrada, pDAB105739 (*Z. mays* c.v. B104), insertado en el vector de destino, pDAB10197.

La **FIG. 10** muestra la expresión del gen de *PhiYFP* en callos de plantas T_0 para las construcciones de expresión binaria pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73) y pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104)

La **FIG. 11** muestra la expresión del gen de *PhiYFP* en polen de plantas T_1 para las construcciones de expresión binaria pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73), pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104) y un control negativo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

Tal como se usan en la presente, los artículos “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente y de forma inequívoca indique lo contrario.

Tal como se usa en la presente, el término "retrocruza" se refiere a un proceso en el cual un reproductor cruza la progenie híbrida nuevamente con uno de los progenitores, por ejemplo, un F1 híbrido de primera generación con uno de los genotipos parentales del híbrido F1.

Tal como se usa en la presente, el término "intrón" se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico comprendida en un gen (o secuencia de nucleótidos expresada de interés) que se transcribe pero no se traduce. Los intrones incluyen una secuencia de ácido nucleico sin traducción dentro de

una secuencia expresada de ADN, así como una secuencia correspondiente en moléculas de ARN transcritas a partir de la misma.

Una construcción descrita en la presente también puede contener secuencias que potencian la traducción y/o estabilidad de ARNm como intrones. Un ejemplo de uno de dichos intrones es el primer intrón del gen II de la variante de histona H3 de *Arabidopsis thaliana* o cualquier otra secuencia de intrones que se conozca comúnmente. Los intrones se pueden utilizar en combinación con una secuencia del promotor para potenciar la traducción y/o estabilidad del ARNm.

Tal como se usan en la presente, los términos "región sin traducción 5'" o "5'-UTR" se refieren a un segmento sin traducción en el extremo 5' de pre-ARNm o ARNm maduros. Por ejemplo, en ARNm maduros, una 5'-UTR típicamente alberga en su extremo 5' un casquete de 7-metilguanosina y está implicada en muchos procesos como el empalme, la poliadenilación, la exportación de ARNm hacia el citoplasma, la identificación del extremo 5' del ARNm mediante la maquinaria de traducción, y la protección del ARNm contra la degradación.

Tal como se usan en la presente, los términos "región sin traducción 3'" o "3'-UTR" se refieren a un segmento sin traducción en el extremo 3' de pre-ARNm o ARNm maduros. Por ejemplo, en los ARNm maduros, esta región alberga el extremo poli-(A) y se sabe que tiene una incidencia variada en la estabilidad del ARNm, el inicio de la traducción y la exportación de ARNm.

Tal como se usa en la presente, el término "señal de poliadenilación" se refiere a una secuencia de ácido nucleico presente en los transcriptos de ARNm que permite que los transcriptos, cuando se encuentran en presencia de una poli-(A) polimerasa, se poliadenilen en el sitio de poliadenilación, por ejemplo, ubicado 10 a 30 bases corriente abajo de la señal de poli-(A). En la técnica se conocen muchas señales de poliadenilación y son útiles para la presente invención. Un ejemplo de secuencia incluye AAUAAA y variantes de esta, 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 (incluyendo una proteína o ácido nucleico) que se separó de otros componentes biológicos en la célula del organismo donde se produce naturalmente el componente (es decir, otro ADN cromosómico y extra-cromosómico).

Tal como se usa en la presente, el término "purificado" en relación con moléculas de ácido nucleico no requiere una pureza absoluta (como una preparación homogénea). Por el contrario "purificado" representa una indicación de que la secuencia es relativamente más pura

que en su entorno celular natural. Por ejemplo, el nivel "purificado" de ácidos nucleicos debería ser al menos 2-5 veces mayor en términos de niveles de concentración o expresión génica en comparación con su nivel natural.

Las moléculas de ADN reivindicadas se pueden obtener directamente del ADN total o del ARN total. Adicionalmente, los clones de ADNc no son de origen natural, sino que se obtienen preferentemente mediante manipulación de una sustancia de origen natural parcialmente purificada (ARN mensajero). La construcción de una genoteca de ADNc a partir de ARNm implica la creación de una sustancia sintética (ADNc). Los clones de ADNc individuales se pueden purificar a partir de la genoteca sintética mediante selección clonal de las células que transportan la genoteca de ADNc. Por lo tanto, el proceso que incluye la construcción de una genoteca de ADNc a partir de ARNm y purificación de clones de ADNc distintos proporciona una purificación de aproximadamente 10^6 veces del mensaje natural. De la misma forma, una secuencia de ADN promotor se puede clonar en un plásmido. Dicho clon no es de origen natural, sino que se obtiene preferentemente a través de la manipulación de una sustancia de origen natural parcialmente purificada, como una genoteca de ADN genómico. Por lo tanto, la purificación de al menos un orden de magnitud, preferentemente dos o tres órdenes y, más preferentemente, cuatro o cinco órdenes de magnitud, se ve favorecida en estas técnicas.

De manera similar, la purificación representa una indicación de que tuvo lugar un cambio químico o funcional en la secuencia de ADN componente. Las proteínas y moléculas de ácido nucleico "purificadas" incluyen proteínas y moléculas de ácido nucleico purificadas a través de métodos de purificación estándar. El término "purificado" también abarca proteínas y ácidos nucleicos elaborados a través de métodos de ADN recombinante en la célula hospedadora (p. ej., células vegetales), así como péptidos, proteínas y moléculas de ácido nucleico químicamente sintetizados.

El término "recombinante" significa una célula u organismo donde tuvo lugar recombinación genética. También incluye una molécula (p. ej., un vector, plásmido, ácido nucleico, polipéptido o un ARN pequeño) que se alteró de manera artificial o sintética (es decir, no natural) mediante intervención humana. La alteración se puede realizar en la molécula dentro o fuera de su ambiente o estado natural.

Tal como se usa en la presente, el término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual se transcribe un polinucleótido en ARNm (incluyendo moléculas de ARN pequeño) y/o el proceso mediante el cual el ARNm transcrito (también denominado "transcrito") se traduce

posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. La expresión génica puede estar influenciada por señales externas, por ejemplo, exposición de una célula, tejido u organismo a un agente que aumente o disminuya la expresión génica. La expresión de un gen también puede regularse en cualquier lugar en la vía desde el ADN hasta el ARN hasta la proteína. La regulación de la expresión génica tiene lugar, por ejemplo, mediante controles que actúan en la transcripción, traducción, transporte de ARN y procesamiento, degradación de moléculas intermediarias, como ARNm, o mediante la activación, inactivación, compartimentalización o degradación de moléculas de proteínas específicas luego de haberse creado, o mediante combinaciones de los mismos. La expresión génica se puede medir a nivel del ARN o a nivel de la proteína mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, 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 usan en la presente, los términos "silenciamiento génico basado en homología" o "HBGS" son términos genéricos que incluyen tanto silenciamiento génico durante la traducción como silenciamiento génico pos-traducción. El silenciamiento de un locus diana mediante un locus de silenciamiento no vinculado puede producirse a partir de la inhibición de la transcripción (p. ej., silenciamiento génico durante la traducción, TGS) o degradación de ARNm (p. ej., silenciamiento génico pos-traducción, PTGS), debido a la producción de ARN bicatenario (ARNdc) correspondiente al promotor o secuencias transcritas, respectivamente. La implicancia de componentes celulares distintos en cada proceso sugiere que el PTGS y TGS inducidos por ARNdc son probablemente el resultado de la diversificación de un mecanismo antiguo común. No obstante, ha sido difícil lograr una comparación rigurosa del TGS y PTGS, debido a que esta se apoya generalmente en el análisis de loci de silenciamiento distintos. Se puede describir un único locus transgénico para desencadenar tanto el TGS como el PTGS, debido a la introducción de ARNdc que corresponde al promotor y las secuencias transcritas de genes diana diferentes.

Tal como se usan en la presente, los términos "molécula de ácido nucleico", "ácido nucleico" o "polinucleótido" (los tres sinónimos entre sí) hacen referencia a una forma polimérica de nucleótidos que puede incluir tanto cadenas sentido como anti-sentido de ARN, ADNc, ADN genómico y formas sintéticas, así como polímeros de mezclas de las mismas. Un "nucleótido" puede referirse a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una molécula de ácido nucleico tiene una longitud normalmente de al menos diez bases, salvo que se especifique lo contrario. Los términos pueden hacer referencia a una molécula

de ARN o ADN de una longitud indeterminada. Los términos incluyen formas de ADN mono- y bicatenario. Una molécula de ácido nucleico puede incluir cualquiera o ambos nucleótidos modificados y de origen natural enlazados mediante enlaces de nucleótidos de origen natural y/o de origen no natural.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden modificar química o bioquímicamente o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivadas, como observará fácilmente un experto en la técnica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, sustitución de uno o más nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótidos (p. ej., enlaces sin carga, como fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc., enlaces con carga, como fosforotioatos, fosforoditioatos, etc., restos colgantes como péptidos, intercaladores como acridina, psoralén, etc., quelantes, alquilantes y enlaces modificados como ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). El término "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier conformación topológica, incluyendo conformaciones de cadena simple, cadena doble, estructura doble parcial, estructura triple, horquillada, circular y de candado.

La transcripción procede de 5' a 3' a lo largo de la cadena de ADN. Esto significa que el ARN se forma mediante adición en secuencia de ribonucleótido-5'-trifosfatos al extremo 3' de la cadena creciente con una eliminación necesaria del pirofosfato. En una molécula de ácido nucleico lineal o circular, los elementos separados (p. ej., secuencias de nucleótidos particulares) se pueden denominar como "corriente arriba" con relación a otro elemento si ambos se encuentran enlazados o estarían enlazados al mismo ácido nucleico en el sentido 5' desde ese elemento. De manera similar, los elementos separados se puede denominar como "corriente abajo" con relación a otro elemento si se encuentran o estarían enlazados al mismo ácido nucleico en el sentido 3' desde ese elemento.

Tal como se usa en la presente, el término "posición de la base" se refiere a la ubicación de una base o residuo de nucleótidos dados dentro de un ácido nucleico designado. Un ácido nucleico designado puede definirse mediante la alineación con un ácido nucleico de referencia.

Tal como se usa en la presente, el término "hibridación" se refiere a un proceso donde los oligonucleótidos y sus análogos se hibridan mediante enlaces hidrógeno, que incluye enlaces hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso, entre bases complementarias. En términos generales, las moléculas de ácido nucleico consisten en bases nitrogenosas que son pirimidinas, como citosina (C), uracilo (U) y timina (T) o purinas, como adenina (A) y guanina (G). Las bases nitrogenosas forman enlaces hidrógeno entre una pirimidina y una purina y el enlace de una pirimidina a una purina se denomina un "emparejamiento de bases". De manera más específica,

A formará un enlace hidrógeno específico con T o U, y G se enlazará de forma específicamente a C. "Complementario" se refiere al emparejamiento de bases que tiene lugar entre dos secuencias de ácido nucleico distintas o dos regiones distintas de la misma secuencia de ácido nucleico.

Tal como se utilizan en la presente, los términos "específicamente hibridable" y "específicamente complementario" se refieren a un grado de complementariedad suficiente, de forma que tenga lugar una unión estable y específica entre un oligonucleótido y un ADN o ARN diana. Los oligonucleótidos no necesitan ser 100 % complementarios con la secuencia diana para hibridarse de forma específica. Un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la molécula de ADN o ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana y existe un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica de un oligonucleótido a secuencias que no son diana en condiciones en que se desea la unión específica, por ejemplo, en condiciones fisiológicas en el caso de sistemas o ensayos *in vivo*. Dicha unión se denomina una hibridación específica. Las condiciones de hibridación que producen grados particulares de rigurosidad variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación seleccionado y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico que se hibriden. Generalmente, la temperatura de la hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{2+}) de un amortiguador de hibridación asistirá a la rigurosidad de la hibridación, si bien los tiempos de lavado también influyen en la rigurosidad. Los cálculos con respecto a las condiciones de hibridación necesarias para obtener grados particulares de rigurosidad de tratan en Sambrook *et ál.* (ed.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., tomos 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.

Tal como se usa en la presente, el término "condiciones rigurosas" comprende condiciones en las cuales solamente tiene lugar la hibridación si hay menos de un 50 % de emparejamiento incorrecto entre la molécula de hibridación y el ADN diana. "Condiciones rigurosas" incluye niveles particulares adicionales de rigurosidad. Por lo tanto, tal como se utiliza en la presente, condiciones de "rigurosidad moderada" son aquellas en las que no se hibridan las moléculas con más de un 50 % de emparejamiento incorrecto de secuencia, condiciones de "rigurosidad elevada" son aquellas en las que no se hibridan las secuencias con más de un 20 % de emparejamiento incorrecto y condiciones de "rigurosidad muy elevada" son aquellas en las que no se hibridan las secuencias con más de un 10 % de emparejamiento incorrecto.

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

- Rigurosidad muy elevada: Hibridación en amortiguador SSC 5x a 65 °C durante 16 horas, lavar dos veces en amortiguador SSC 2x a temperatura ambiente durante 15 minutos cada vez y lavar dos veces en amortiguador SSC 0,5x a 65 °C durante 20 minutos cada vez.
- Rigurosidad elevada: Hibridación en amortiguador SSC 5-6x a 65-70 °C durante 16-20 horas, lavar dos veces en amortiguador SSC 2x a temperatura ambiente durante 5-20 minutos cada vez y lavar dos veces en amortiguador SSC 1x a 55-70 °C durante 30 minutos cada vez.
- Rigurosidad moderada: Hibridación en amortiguador SSC 6x a temperatura ambiente hasta 55 °C durante 16-20 horas, lavar al menos dos veces en amortiguador SSC 2-3x a temperatura ambiente hasta 55 °C durante 20-30 minutos cada vez.

En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridables pueden mantenerse enlazadas en condiciones de hibridación de rigurosidad muy elevada. En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridables pueden mantenerse enlazadas en condiciones de hibridación de rigurosidad elevada. En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridables pueden mantenerse enlazadas 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 largos o mediante precursores de nucleótidos individuales de polimerización. Los sintetizadores automáticos permiten la síntesis de oligonucleótidos de hasta varios cientos de pares de bases de longitud. Debido a que los oligonucleótidos se pueden unir a una secuencia de nucleótidos complementaria, se pueden utilizar como sondas para detectar ADN o ARN. Los oligonucleótidos compuestos por ADN (oligodesoxirribonucleótidos) se pueden utilizar en la Reacción de Cadena de Polimerasa, una técnica para amplificación de secuencias de ADN pequeño. En la reacción de cadena de polimerasa, un oligonucleótido se denomina típicamente un "cebador", que permite que una polimerasa de ADN extienda el oligonucleótido y replique la cadena complementaria.

Tal como se usan en la presente, los términos "reacción de cadena de polimerasa" o "PCR" se refieren a un procedimiento o técnica donde se amplifican cantidades mínimas de ácido nucleico, ARN y/o ADN, como se describe en la patente estadounidense n.º 4,683,195.

En términos generales, la información de secuencia de los extremos de la región de interés o posterior debe encontrarse disponible, de forma que se puedan diseñar dichos cebadores de oligonucleótidos. Los cebadores de PCR serán idénticos o similares en su secuencia a cadenas opuestas de la plantilla de ácido nucleico que se desea amplificar. Los nucleótidos 5' terminales de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. Se puede utilizar PCR para amplificar secuencias de ARN o secuencias de ADN específicas a partir de ADNc y ADN genómico total transcrito de ARN celular total, bacteriófagos o secuencias de plásmidos, etc. Ver 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 que tiene la capacidad de actuar como un punto de inicio de la síntesis junto con una cadena complementaria, cuando las condiciones son adecuadas para la síntesis de un producto de extensión del cebador. Las condiciones de sintetización incluyen la presencia de cuatro trifosfatos de desoxirribonucleótidos diferentes (es decir, A, T, G y C) y al menos un agente que induce la polimerización o enzimas como la Transcriptasa Inversa o polimerasa de ADN. Estos reactivos se encuentran presentes típicamente en un amortiguador adecuado que puede incluir constituyentes que son co-factores o que afectan condiciones, como el pH y similares, a diversas temperaturas adecuadas. Un cebador es preferentemente una secuencia monocatenaria, de forma que se optimice la eficacia de la amplificación, pero se pueden utilizar secuencias bicatenarias.

Tal como se usa en la presente, el término "sonda" se refiere a una secuencia de oligonucleótido o polinucleótido que se hibrida con una secuencia diana. En el procedimiento del ensayo estilo TaqMan[®] o TaqMan[®], la sonda se hibrida con una parte de la diana situada entre el sitio de hibridación de los dos cebadores. Una sonda incluye alrededor de ocho nucleótidos, alrededor de diez nucleótidos, alrededor de quince nucleótidos, alrededor de veinte nucleótidos, alrededor de treinta nucleótidos, alrededor de cuarenta nucleótidos o alrededor de cincuenta nucleótidos. En algunas modalidades, una sonda incluye entre alrededor de ocho nucleótidos y alrededor de quince nucleótidos.

En el procedimiento del ensayo de transferencia Southern, la sonda se hibrida con un fragmento de ADN unido a una membrana. Una sonda incluye alrededor de diez nucleótidos,

alrededor de 100 nucleótidos, alrededor de 250 nucleótidos, alrededor de 500 nucleótidos, alrededor de 1.000 nucleótidos, alrededor de 2.500 nucleótidos o alrededor de 5.000 nucleótidos. En algunas modalidades, una sonda incluye entre alrededor de 500 nucleótidos y alrededor de 2.500 nucleótidos.

Una sonda puede incluir adicionalmente una etiqueta detectable, como una etiqueta radioactiva, una etiqueta biotinilada, un fluoróforo (p. ej., Texas-Red[®], isotiocianato fluoresceína, etc.). La etiqueta detectable se puede unir de forma covalente directamente al oligonucleótido de la sonda, de forma que la etiqueta se encuentre en el extremo 5' o 3' de la sonda. Una sonda que comprende un fluoróforo también puede incluir un tinte inactivador (p. ej., Black Hole Quencher[™], Iowa Black[™], etc.).

Tal como se usan en la presente, los términos "identidad de secuencia" o "identidad" se pueden utilizar de forma intercambiable y hacen referencia a residuos de ácido nucleico en dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia en un área de comparación específica.

Tal como se usa en la presente, el término "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje de homología de secuencia" se refiere al valor determinado comparando dos secuencias alineadas de manera óptima (p. ej., secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos) en una área de comparación, donde la parte de una secuencia en el área de comparación puede comprender adiciones, sustituciones, emparejamientos incorrectos y/o eliminaciones (es decir, huecos) en comparación con una secuencia de referencia para obtener alineación óptima de las dos secuencias. Un porcentaje se calcula determinando la cantidad de posiciones donde aparece un residuo de aminoácidos o ácidos nucleicos idénticos en ambas secuencias para proporcionar la cantidad de posiciones emparejadas, dividiendo la cantidad de posiciones emparejadas entre la cantidad total de posiciones en el área de comparación y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. En la técnica se conocen los métodos para alinear secuencias para la comparación. En la técnica también se conocen diversos programas informáticos o bioinformáticos y algoritmos de alineación, como ClustalW y Sequencher y/o estos se describen, por ejemplo, en: 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. E.U.A.* 85:2444; Higgins y Sharp (1988) *Gene* 73:237-44; Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-3; Corpet *et ál.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang *et ál.* (1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65;

Pearson *et ál.* (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-31; Tatiana *et ál.* (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50.

La herramienta de búsqueda de alineación local básica del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (BLAST™; Altschul *et ál.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10) se encuentra disponible de diversas fuentes, incluyendo el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Bethesda, MD), así como en Internet, para su uso en conexión con diversos programas de análisis de secuencias. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia utilizando este programa se encuentra disponible en Internet en la sección "ayuda" de BLAST™. Para comparaciones de secuencias de ácido nucleico, se puede utilizar la función "secuencias Blast 2" del programa BLAST™ (Blastn), con los parámetros predeterminados. Las secuencias de ácidos nucleicos con una similitud aun mayor con respecto a las secuencias de referencia mostrarán una mayor identidad porcentual cuando se evalúan con este método.

Tal como se usa en la presente, el término "unido de forma operativa" se refiere a un ácido nucleico colocado en una relación funcional con otro ácido nucleico. En términos generales, "unido de forma operativa" puede significar que los ácidos nucleicos son contiguos. La unión se puede lograr mediante enlace en sitios de restricción convenientes. En caso de que no existan dichos sitios, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se ligan o hibridan al ácido nucleico y se utilizan para vincular el fragmento de polinucleótido contiguo. No obstante, los elementos no necesitan ser contiguos para unirse de forma operativa.

Tal como se usa en la presente, el término "promotor" se refiere a una región de ADN que se ubica generalmente corriente arriba de un gen (es decir, hacia el extremo 5' de un gen) y es necesaria para iniciar y llevar adelante la transcripción del gen. Un promotor puede permitir la activación adecuada o represión 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 del promotor, lo cual produce el reclutamiento de polimerasa de ARN, una enzima que sintetiza el ARN de la región de codificación del gen. El promotor se refiere generalmente a todos los elementos reguladores génicos ubicados corriente arriba del gen, incluyendo 5'-UTR, intrones y secuencias líder.

Tal como se usa en la presente, el término "promotor corriente arriba" se refiere a una secuencia de polinucleótidos contigua que es suficiente para dirigir el inicio de la transcripción. Tal como se usa en la presente, un promotor corriente arriba comprende el sitio de inicio de la transcripción con diversos motivos de secuencias, que incluyen una caja TATA, secuencia de inicio

(Intr), elementos de reconocimiento TFIIB (BRE) y otros motivos promotores (Jennifer, E.F. et ál, (2002) *Genes & Dev.*, 16: 2583-2592). El promotor corriente arriba proporciona el sitio de acción para la polimerasa de ARN II, una enzima de subunidades múltiples con los factores de transcripción basal o general como TFIIA, B, D, E, F y H. Estos factores se ensamblan en un complejo de pre-inicio (PIC) de la transcripción que cataliza la síntesis de ARN de una plantilla de ADN.

La activación del promotor corriente arriba la realiza la adición de elementos reguladores de secuencia de ADN a los que se unen diversas proteínas e interactúan posteriormente con el complejo de inicio de la transcripción para activar la expresión génica. Estas secuencias de elementos de regulación génica interactúan con factores de unión a ADN específicos. Estos motivos de secuencias se pueden denominar algunas veces como elementos *cis*. Dichos elementos *cis*, a los que se unen los factores de transcripción específicos del tejido o específicos del desarrollo, de forma individual o en combinación, pueden determinar el patrón de expresión espaciotemporal de un promotor a nivel de la transcripción. Estos elementos *cis* varían ampliamente en el tipo de control que ejercen sobre genes unidos de forma operativa. Algunos elementos actúan aumentando la transcripción de genes unidos de forma operativa en respuesta a respuestas ambientales (p. ej., temperatura, humedad y heridas). Otros elementos *cis* pueden responder a señales de desarrollo (p. ej., germinación, maduración de semilla y floración) o información espacial (p. ej., especificidad de tejidos). Véase, por ejemplo, Langridge *et ál.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 86:3219-23. Estos elementos *cis* se encuentran a una distancia variada del punto de inicio de la transcripción. Algunos elementos *cis* (denominados elementos proximales) son adyacentes a una región promotora de núcleo mínimo, mientras que otros elementos pueden encontrarse a diversas kilobases 5' corriente arriba o 3' corriente abajo del promotor (potenciadores).

Tal como se usa en la presente, el término "transformación" comprende todas las técnicas donde se puede introducir una molécula de ácido nucleico 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), transferencia mediada por *Agrobacterium*, absorción directa de ADN, transformación mediada por WHISKERS™ y bombardeo con microproyectiles. Estas técnicas pueden utilizarse tanto para la transformación estable como la transformación transitoria de una célula vegetal. "Transformación estable" se refiere a la introducción de un fragmento de ácido nucleico en un genoma de un organismo hospedador que produce una herencia genéticamente estable. Una vez que se logró la

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

Tal como se usa en la presente, el término "transducir" se refiere a un proceso donde 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 (p. ej., un gen con resistencia a herbicidas), un gen que codifica un compuesto útil en industria o farmacéutica o un gen que codifica un rasgo agrícola deseable. En aun otro ejemplo, un transgén es una secuencia de ácido nucleico antisentido, donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico antisentido inhibe la expresión de una secuencia de ácido nucleico diana. Un transgén puede contener secuencias reguladoras unidas de forma operativa al transgén (p. ej., un promotor, intrón, 5'-UTR o 3'-UTR). En algunas modalidades, un ácido nucleico de interés es un transgén. No obstante, en otras modalidades, un ácido nucleico de interés es un ácido nucleico endógeno, donde se desean copias genómicas adicionales del ácido nucleico endógeno o un ácido nucleico que se encuentra en la orientación antisentido con respecto a la secuencia de un ácido nucleico diana en un organismo hospedador.

Tal como se usa en la presente, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico tal como se introduce a una célula, mediante lo cual se produce una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en la célula hospedadora, tal como un origen de replicación. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, un plásmido, cósmido, bacteriófago, cromosoma artificial bacteriano (BAC) o virus que transporta ADN exógeno en una célula. Un vector puede incluir también uno o más genes, moléculas antisentido, genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, provocando así que la célula exprese proteínas y/o moléculas ácidos nucleicos codificadas por el vector. Un vector puede incluir opcionalmente materiales para asistir en la obtención de ingreso de la molécula de ácido nucleico a la célula (p. ej., un liposoma).

Tal como se usan en la presente, los términos "casete", "casete de expresión" y "casete de expresión génica" se refieren a un segmento de ADN que se puede insertar en un ácido nucleico o polinucleótido en sitios de restricción específicos o mediante recombinación homóloga. Un segmento de ADN comprende un polinucleótido que contiene un gen de 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 traducción. En una modalidad, un casete de expresión puede incluir un polinucleótido que codifica un ARN pequeño o un polinucleótido de interés y puede tener elementos además del polinucleótido para facilitar la transformación de una célula hospedadora particular. En una modalidad, un casete de expresión génica también puede incluir elementos que permiten la mejor expresión de ARN pequeño o un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés en una célula hospedadora. Estos elementos pueden incluir, de modo no taxativo: un promotor, un promotor mínimo, un potenciador, un elemento de respuesta, un intrón, una 5'-UTR, una 3'-UTR, una secuencia de terminación, 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 codifica en última instancia un péptido o una proteína o su secuencia de aminoácidos equivalente, p. ej., una enzima, que no se encuentra presente normalmente en el organismo hospedador y se puede expresar en la célula hospedadora en condiciones adecuadas. Como tal, "secuencias de codificación heteróloga" puede incluir una o más copias adicionales de las secuencias de codificación que no se encuentran normalmente presentes en la célula hospedadora, de forma que la célula exprese copias adicionales de una secuencia de codificación que no se encuentran presentes normalmente en las células. Las secuencias de codificación heterólogas pueden ser ARN o cualquier tipo del mismo (p. ej. ARNm), ADN o cualquier tipo de este (p. ej., ADNc) o un híbrido de ARN/ADN. Los ejemplos de secuencias de codificación incluyen, 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.

"Secuencias de codificación heterólogas" también incluye la parte codificante del péptido o la enzima (es decir, la secuencia de ADNc o ARNm), la parte codificante de la unidad de transcripción de longitud completa (es decir, los intrones y exones que comprenden genes), secuencias con "codones optimizados", secuencias truncadas u otras formas de secuencias alteradas que codifican la enzima o codifican 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, con la eliminación en posición N-terminal, C-terminal o interna. Se prevén las formas truncadas siempre que tengan la capacidad catalítica indicada en la presente.

Tal como se usa en la presente, el término "control" se refiere a una muestra que se utiliza en un procedimiento analítico con fines de comparación. Un control puede ser "positivo" o "negativo". Por ejemplo, cuando la finalidad de un procedimiento analítico es detectar un transcripto o polipéptido expresado de forma diferencial en células o tejidos, generalmente es preferible incluir un control positivo, como una muestra de una planta conocida que presente la expresión deseada, y un control negativo, como una muestra de una planta conocida que carezca de la expresión deseada.

Tal como se usa en la presente, el término "planta" incluye plantas y partes de plantas que incluyen, de modo no taxativo, células vegetales y tejidos vegetales, como hojas, callos, tallos, raíces, flores, polen y semillas. Una clase de plantas que se puede utilizar en la presente invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas superiores e inferiores susceptibles de mutagénesis, incluyendo angiospermas, gimnospermas, helechos y algas multicelulares. Por lo tanto, "planta" incluye plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Los ejemplos de plantas dicotiledóneas incluyen tabaco, *Arabidopsis*, soja, tomate, papaya, canola, girasol, algodón, alfalfa, papa, parra, gandul, arveja, *Brassica*, garbanzo, remolacha, semilla de colza, sandía, melón, pimienta, maní, zapallo, rábano, espinaca, calabaza, brócoli, repollo, zanahoria, coliflor, apio, repollo chino, pepino, berenjena y lechuga. Los ejemplos de plantas monocotiledóneas incluye maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, cebada, centeno, sorgo, orquídeas, bambú, bananas, totora, lirios, avena, cebolla, mijo y tritical.

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

Tal como se usa en la presente, el término "gen marcador seleccionable" se refiere a un gen que se utiliza opcionalmente en la transformación vegetal, por ejemplo, para proteger células vegetales de un agente selectivo o proporcionarle resistencia/tolerancia a un agente selectivo. Además, "gen marcador seleccionable" pretende abarcar genes indicadores. Solamente las células

o plantas que reciben un marcador seleccionable funcional pueden dividirse o crecer en condiciones con un agente selectivo. Los ejemplos de agentes selectivos pueden incluir, por ejemplo, antibióticos, incluyendo espectinomicina, neomicina, canamicina, paromomicina, gentamicina e higromicina. Estos marcadores seleccionables incluyen fosfotransferasa de neomicina (npt II), que expresa una enzima que confiere resistencia a la canamicina antibiótica y genes para los antibióticos relacionados neomicina, paromomicina, gentamicina y G 418 o el gen para higromicina fosfotransferasa (hpt), que expresa una enzima que confiere resistencia a la higromicina. Otros genes marcadores seleccionables pueden incluir genes que codifican resistencia a herbicidas, incluyendo *bar* o *pat* (resistencia contra aminio glufosinato o fosfinotricina), *acetolactato sintasa* (ALS, resistencia contra inhibidores como sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TP), oxibenzoatos de pirimidinilo (POB) y triazolinonas de carbonil sulfonilamino que evitan la primera etapa en la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada), glifosato, 2,4-D y resistencia o sensibilidad a metales. Los ejemplos de "genes informantes" que se pueden utilizar como gen marcador seleccionable incluyen la observación visual de proteínas de genes informantes expresados, como proteínas que codifican β -glucuronidasa (GUS), luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), DsRed, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), fosfatasa alcalina y similares. La frase "positiva para el marcador" se refiere a plantas que se transformaron para incluir un gen marcador seleccionable.

Tal como se usa en la presente, el término "marcador detectable" se refiere a una etiqueta que tiene capacidad de detección, como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante metálico o enzima. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, de modo no taxativo, los siguientes: etiquetas fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, fósforos lantánidos), etiquetas enzimáticas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un informante secundario (p. ej., secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metales, etiquetas de epítopos). En una modalidad, un marcador detectable se puede unir mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

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

Salvo que se indique específicamente lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Las definiciones de términos comunes en la biología molecular se pueden encontrar, por ejemplo, en: 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.

Promotores como elementos reguladores de la expresión génica

Los promotores vegetales utilizados para aplicaciones biotecnológicas o de investigación básica son generalmente unidireccionales y dirigen la expresión constitutiva de un transgén fusionado a su extremo 3' (corriente abajo). A menudo es necesario expresar fuertemente transgenes dentro de las plantas para la modificación metabólica y el apilamiento de rasgos. Además, se necesitan típicamente promotores novedosos múltiples en los cultivos transgénicos para llevar adelante la expresión genes múltiples. En la presente se describe un promotor constitutivo que puede dirigir la expresión de un transgén fusionado a su extremo 3'.

El desarrollo de productos transgénicos cada vez es más complejo, lo cual requiere la expresión fuerte de transgenes y el apilamiento de transgenes múltiples en un único locus. De manera tradicional, cada transgén requería un promotor exclusivo para la expresión donde se requerían promotores múltiples para expresar diferentes transgenes dentro de una pila génica. Con el mayor tamaño de las pilas génicas, este método frecuentemente lleva a un uso repetido del mismo promotor para obtener niveles similares de patrones de expresión de diferentes transgenes para la expresión de un único rasgo poligénico.

Se sabe que las construcciones de genes múltiples impulsadas por el mismo promotor provocan silenciamiento génico que produce productos transgénicos menos eficaces en el campo. El exceso de sitios de unión al factor de transcripción (TF) debido a la repetición del promotor puede provocar el agotamiento de TF endógenos y llevar a la inactivación durante la traducción. El silenciamiento de transgenes probablemente afecte de forma no deseada el rendimiento de una planta transgénica producida para expresar transgenes. Las secuencias repetitivas dentro de un transgén

pueden llevar a una recombinación homóloga intra-locus génica que produzca reajustes de polinucleótidos.

Además de los promotores constitutivos, los promotores específicos de los órganos o específicos de los tejidos llevan adelante la expresión génica en determinados tejidos como el grano, la raíz, la hoja, el callo, el polen o tapete de la planta. Los promotores específicos de la etapa de desarrollo y del tejido llevan adelante la expresión de genes que se expresan en tejidos particulares o en períodos particulares durante el desarrollo de la planta. Los promotores específicos del tejido son necesarios para determinadas aplicaciones en la industria de las plantas transgénicas y son deseables ya que permiten la expresión específica de genes heterólogos en un tejido y/o en una etapa de desarrollo seleccionada, lo cual indica la expresión del gen heterólogo de forma diferencial en diversos órganos, tejidos y/o diferentes tiempos, pero no en otros.

Por ejemplo, la mayor resistencia de una planta a la infección por patógenos del suelo se puede lograr transformando el genoma vegetal con un gen de resistencia a patógenos de forma que se exprese fuertemente la proteína de resistencia al patógeno dentro de la planta. De forma alternativa, puede ser deseable expresar un transgén en tejidos vegetales que se encuentren en una fase de desarrollo o crecimiento particular como, por ejemplo la elongación o división celular. Otra aplicación es el deseo del uso de promotores específicos del tejido, de forma que los promotores confieran la expresión de transgenes que codifican un rasgo agronómico en las partes de plantas en desarrollo (es decir, raíces, hojas, callos o polen).

Los promotores descritos en la presente son herramientas prometedoras para realizar construcciones transgénicas comerciales que contengan genes múltiples. Estos promotores también proporcionan estabilidad estructural en hospedadores bacterianos y estabilidad funcional en células vegetales, como la reducción del silenciamiento transgénico, para permitir la expresión de transgenes. También se pueden obtener promotores con rangos de expresión variados utilizando los métodos descritos en la presente. En comparación con las construcciones transgénicas que utilizan un único promotor muchas veces, las construcciones de promotores diversificados descritas en la presente solicitud son más compatibles para los análisis moleculares corriente abajo de eventos transgénicos. El uso de los promotores diversificados descritos en la presente también puede mitigar los reajustes en loci de multigenes transgénicos durante el direccionamiento con tecnología de dedos de zinc (SHUKLA *et al.* 2009).

Promotores de Ubiquitina-1 de *Zea mays*

El promotor de Ubi-1 de *Zea mays* ha sido un estándar de la industria biotecnológica, utilizado preferentemente para expresión transgénica altamente estable en el maíz (CHRISTENSEN and QUAIL 1996; CHRISTENSEN *et al.* 1992; TOKI *et al.* 1992). Cada transgén requiere normalmente de un promotor específico para la expresión suficiente. Normalmente se necesitan promotores múltiples para expresar diferentes transgenes dentro de una pila génica. Este paradigma frecuentemente lleva al uso repetido del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* debido a sus niveles elevados deseados de expresión de proteínas y patrón de expresión constitutiva.

No obstante, la introducción deliberada de secuencias repetitivas en un locus transgénico también puede producir efectos negativos no deseados en la estabilidad y expresión de transgenes (FLADUNG y KUMAR 2002; KUMAR y FLADUNG 2000a; KUMAR y FLADUNG 2000b; KUMAR y FLADUNG 2001a; KUMAR y FLADUNG 2001b; KUMAR y FLADUNG 2002; METTE *et ál.* 1999; MOURRAIN *et ál.* 2007). El desafío de una expresión de transgenes coordinados múltiples se puede tratar usando un enfoque de diversidad de promotores, donde se utilizan promotores diferentes para accionar diferentes transgenes con el mismo perfil de expresión (PEREMARTI *et ál.* 2010). La presente solicitud describe una secuencia de promotor de Ubi-1 diversificado obtenida identificando y purificando el promotor novedoso de diferentes genotipos de *Zea mays*.

El inicio de la transcripción y la modulación de la expresión génica en genes vegetales están dirigidos por diversos elementos de secuencias de ADN dispuestos de forma colectiva en una secuencia mayor denominada promotor. Los promotores eucariotas consisten típicamente en un promotor central mínimo y secuencias reguladoras corriente arriba. El promotor central es una extensión mínima de secuencia de ADN contiguo suficiente para dirigir el inicio adecuado de la transcripción. Los promotores centrales en las plantas comprenden generalmente regiones canónicas asociadas con el inicio de la transcripción, como cajas CAAT y TATA (secuencia consenso TATAWAW). El elemento de caja TATA se ubica generalmente aproximadamente a 20 a 35 pares de bases (pb) corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS). La activación del promotor central se logra mediante secuencias de regulación corriente arriba a las cuales se unen diversas proteínas e interactúan posteriormente con el complejo de inicio de la transcripción para activar la expresión génica. Estos elementos reguladores comprenden secuencias de ADN que determinan el patrón de expresión espacio-temporal de un promotor.

Con referencia a la FIG. 1, el promotor génico de Ubi-1 de *Z. mays* se deriva de la línea celular endogámica de *Z. mays* B73. El promotor de Ubi-1 de *Z. mays* está compuesto por aproximadamente 895 pb de una secuencia de ADN ubicada 5' corriente arriba del TSS (es decir,

el elemento corriente arriba). Además, el promotor de Ubi-1 de *Z. mays* está compuesto por alrededor de 1093 pb de una secuencia de ADN ubicada 3' corriente abajo del TSS (ver la patente estadounidense n.º 5,510,474). Por lo tanto, el promotor de Ubi-1 de *Z. mays* está compuesto por aproximadamente 2 pares de kilo-bases (kb) de una secuencia de ADN total.

El elemento corriente arriba del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* comprende una caja TATA ubicada aproximadamente 30 pb 5' corriente arriba del TSS (FIGS. 1 y 3). Además, el elemento corriente arriba comprende dos elementos de consenso de choque término superpuestos ubicados inmediatamente 5' corriente arriba del TSS. Una 5'-UTR o secuencia líder de 82 pb se ubica inmediatamente 3' corriente abajo del TSS y está seguida por un intrón que se extiende desde la base 83 hasta la 1093 (FIGS. 1 y 3).

El trabajo previo describió mayor expresión génica de genes y/o transgenes regulados por el promotor de Ubi-1 de *Z. mays*. Por ejemplo, la fusión de transcripción del gen de cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) con el promotor de Ubi-1 de *Z. mays* proporcionó un nivel más de 10 veces superior de actividad de CAT en los protoplastos de maíz que la expresión impulsada por el promotor del virus del mosaico del coliflor 35S (CHRISTENSEN y QUAIL 1996; CHRISTENSEN *et al.* 1992).

Además del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* de control, la presente solicitud describe un promotor de Ubi-1 de maíz novedoso. A diferencia del promotor de Ubi-1 de control derivado del genotipo de *Z. mays* c.v. B73, el promotor de Ubi-1 novedoso se derivó del genotipo de *Z. mays* c.v. B104. Se proporcionan construcciones y métodos que utilizan un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* que comprende una secuencia de polinucleótidos. En una modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos del gen de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como la siguiente:

```
GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTC
TAAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTGTACACTTGTTTGAAGTGCAG
TTTATCTATCTTTATACATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTA
TAGTACTACAATAATATCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGA
CATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATC
TTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCTATATAAT
ACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTTTTTA
TAGACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATTAAG
AAAACATAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATATAAAATAGA
```

ATAAAATAAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTAaaaaaa
 ACTAAGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTAAACGC
 CGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGG
 CCAAGCGAAGCAGACGGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCG
 AGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCG
 TGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTC
 ACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTT
 CCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTCCACACCCTCTTTCCCCAACCT
 CGTGTTGTTTCGGAGCGCACACACACAACCAGATCTCCCCAAATCCACCCG
 TCGGCACCTCCGCTTCAAGGTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCTCTC
 TACCTTCTCTAGATCGGCGTTCGGGTCCATGCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTC
 TACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTA
 GCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGACACGTTCTGATTGCTAACTT
 GCCAGTGTTTCTCTTTGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACG
 GGATCGATTTTCATGATTTTTTTTTGTTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTTGCCCTTTT
 CCTTTATTTCAATATATGCCGTGCACTTGTTTGTGCGGGTCATCTTTTCATGCTTT
 TTTTGTCTTGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGA
 GTAGAATTCTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAATTTTGGATCTGTATGT
 GTGTGCCATACATATTCATAGTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCG
 ATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGA
 TGCTTTTTGTTCGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTTCATT
 CGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGTATTTATTAATT
 TTGGAACCTGTATGTGTGTGTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGGA
 TGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTACTGATGC
 ATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACC
 TATCTATTATAATAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTCGATCTTGATATACTT
 GGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTAGCCCTGCCTTCAT
 ACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTGCGATGCTCACCTGTTGTTTG
 GTGTTACTTCTGCA (SEQ ID NO: 1)

En otra modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos del gen de Ubi-
 1 de *Z. mays* c.v. B104 como la siguiente:

CCCGGTCTGCCCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAAGTATAAA
AAATTACCACATATTTTTTTGTACACTTATTTGAAGTGTAGTTTATCTATCTC
TATACATATATTTAACTTCACTCTACAAATAATATAGTCTATAATACTAAAA
TAATATTAGTGTTTTAGAGGATCATATAAATAAACTGCTAGACATGGTCTAAA
GGATAATTGAATATTTTGACAATCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGA
TCTCTCTGTTTTTTTTTGCAAATAGCTTGACCTATATAATACTTCATCCATTTTAT
TAGTACATCCATTTAGGATTTAGGGTTGATGGTTTCTATAGACTAATTTTTAGT
ACATCCATTTTATCTTTTTAGTCTCTAATTTTTTTAAAATAAACTCTATTTT
AGTTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAATGAAATAAAATAAATTGACTACA
AATAAAACAAATACCCTTTAAGAAATAAAAAAACTAAGCAAACATTTTTCTT
GTTTCGAGTAGATAATGACAGGCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGA
CACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGC
ACGGCATCTCTGTAGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGT
TGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACG
TGAGGCGGCACGGCAGGCGGCCTCTTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACG
GGGGATTCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAA
ATAGACACCCCTCCACACCCTCTTTCCCCAACCTCGTGTTTCGTTCCGAGCGC
ACACACACGCAACCAGATCTCCCCAAATCCAGCCGTCGGCACCTCCGCTTCA
AGGTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCCTCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGA
TCCGGTCCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGA
GCAAACATGTTTCATGTTTCATGTTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTCGT
TCTAGATCGGAGTAGGATACTGTTTCAAGCTACCTGGTGGATTTATTAATTTT
GTATCTGTATGTGTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGATGG
ATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATG
CATATACAGAGATGCTTTTTTTCTCGCTTGGTTGTGATGATATGGTCTGGTTGG
GCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTA
TTAAAGGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGG
TTTATTAAGGATCTGTATGTATGTGCCTACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAG
ATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTT
ACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTTTTCGCTTGGTTGTGATGATGTGGTCTG
GTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGG
ATTTATTAATTTTGTATCTTTATGTGTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGT

TTAAGATGATGGATGGAAATATTGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGG
GTTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCGGCATCTATTCATATGCTCTA
ACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTGAT
CTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTAGC
CCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTCCGATGCTCA
CCCTGTTGTTTGGTGTACTTCTGCAG (SEQ ID NO: 2)

Los promotores descritos en la presente se caracterizaron mediante clonación y posterior análisis de homología de secuencia de ADN para identificar regiones específicas del promotor (es decir, el promotor corriente arriba, la 5'-UTR y regiones de intrones). Se proporcionan construcciones y métodos que utilizan un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* constitutivo que comprenden secuencias de polinucleótidos de una región de promotor corriente arriba, 5'-UTR o región líder y un intrón para expresar transgenes en plantas. En una modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos del promotor corriente arriba de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como la siguiente:

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTC
TAAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTTGTCACACTTGTTTGAAGTGCAG
TTTATCTATCTTTATACATATATTTAAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTA
TAGTACTACAATAATATCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGA
CATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATC
TTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCTATATAAT
ACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTTTTTA
TAGACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATTAAG
AAAACATAAACTCTATTTTAGTTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATATAAAATAGA
ATAAAATAAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTAATAAA
ACTAAGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTAAACGC
CGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGG
CCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCG
AGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCG
TGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTC
ACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTT
CCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTCCACACCCTCTT (SEQ ID NO: 3)

En otra modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos del promotor corriente arriba de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 como la siguiente:

```
CCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAAGTATAAAA
AAATTACCACATATTTTTTTTGTACACTTATTTGAAGTGTAGTTTATCTATCTC
TATACATATATTTAAACTTCACTCTACAAATAATATAGTCTATAATACTAAAA
TAATATTAGTGTTTTAGAGGATCATATAAATAAACTGCTAGACATGGTCTAAA
GGATAATTGAATATTTTGACAATCTACAGTTTTATCTTTTTTAGTGTGCATGTGA
TCTCTCTGTTTTTTTTTGCAAATAGCTTGACCTATATAATACTTCATCCATTTTAT
TAGTACATCCATTTAGGATTTAGGGTTGATGGTTTCTATAGACTAATTTTTTAGT
ACATCCATTTTATTCTTTTTAGTCTCTAATTTTTTTTAAACTAAACTCTATTTT
AGTTTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAATGAAATAAAATAAATTGACTACA
AATAAAACAAATACCCTTTAAGAAATAAAAAAACTAAGCAAACATTTTTCTT
GTTTCGAGTAGATAATGACAGGCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGA
CACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGC
ACGGCATCTCTGTAGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGT
TGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACG
TGAGGCGGCACGGCAGGCGGCCTCTTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACG
GGGGATTCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAA
ATAGACACCCCTCCACACCCTCTT (SEQ ID NO: 4)
```

Elementos reguladores génicos adicionales

La expresión de transgenes también se pueden regular mediante una 5'-UTR y/o región de intrón ubicada 3' corriente abajo de la secuencia del promotor corriente arriba. Un promotor que comprende una región de promotor corriente arriba unida de forma operativa a una 5'-UTR y/o un intrón puede regular la expresión de transgenes. Mientras que el promotor corriente arriba es necesario para accionar la transcripción, la presencia de una 5'-UTR y/o un intrón puede aumentar los niveles de expresión y generar la producción de más transcritos de ARNm para la traducción y síntesis de proteínas. Además de una 5'-UTR y/o intrón para una secuencia de polinucleótidos del promotor corriente arriba puede ayudar en la expresión estable de un transgén.

Adicionalmente, un promotor constitutivo que comprende una secuencia de polinucleótidos del promotor corriente arriba puede estar seguido por una 5'-UTR o región líder para asistir en la

expresión de transgenes en plantas. En una modalidad, un promotor puede comprender una 5'-UTR o secuencia de polinucleótidos líder del gen de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como la siguiente:

TCCCCAACCTCGTGTTGTTTCGGAGCGCACACACACAACCAGATCTCCCCCA
AATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO: 5)

En otra modalidad, un promotor puede comprender una 5'-UTR o secuencia de polinucleótidos líder del gen de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 como la siguiente:

TCCCCAACCTCGTGTTGTTTCGGAGCGCACACACACGCAACCAGATCTCCCCC
AAATCCAGCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO: 6)

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

GTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCG
TTCCGGTCCATGCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTG
TTAGATCCGTGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCG
ACCTGTACGTCAGACACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGGGG
AATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTTTCATGATTTTT
TTTGTTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTTGGCCTTTTTCCTTTATTTCAATATATGCC
GTGCACTTGTTTGTGCGGGTCATCTTTTCATGCTTTTTTTTTGTCTTGTTGTGATG
ATGTGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTTCAAAC
TACCTGGTGGATTTATTAATTTTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATATTCAT
AGTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACA
TGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTTGTTCGCTTGGT
TGTGATGATGTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTTCATTTCGTTCTAGATCGGAGTAG
AATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGTATTTATTAATTTTGGAACTGTATGTGTGT
GTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGGATGGAAATATCGATCTAGG
ATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTACTGATGCATATACATGATGGCATAT
GCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAAACA
AGTATGTTTTATAATTATTTTCGATCTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAG
CAGCTATATGTGGATTTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGG

TACTGTTTCTTTTGTGCGATGCTCACCTGTTGTTTGGTGTACTTCTGCA
(SEQ ID NO: 7)

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

B104 como la siguiente:

GTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCCTCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGATC
CGGTCCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGAGC
AAACATGTTTCATGTTTCATGTTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTCTGTTCT
AGATCGGAGTAGGATACTGTTTCAAGCTACCTGGTGGATTTATTAATTTTGTA
TCTGTATGTGTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGATGGATG
GAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCAT
ATACAGAGATGCTTTTTTTCTCGCTTGGTTGTGATGATATGGTCTGGTTGGGCG
GTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTA
AAGGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTT
ATTAAAGGATCTGTATGTATGTGCCTACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGAT
GATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTAC
TGATGCATATACAGAGATGCTTTTTTTCTCGCTTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGT
TGGGCGGTCTGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGGAT
TTATTAATTTTGATCTTTATGTGTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGTTT
AAGATGATGGATGGAAATATTGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGG
TTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCGGCATCTATTCATATGCTCTAA
CCTTGAGTACCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTGATC
TTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTAGCC
CTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTCCGATGCTCAC
CCTGTTGTTTGGTGTACTTCTGCAG (SEQ ID NO: 8)

Casetes de expresión del gen indicador y transgén

La expresión de transgenes también se puede regular 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 Ubi-1. En una modalidad, un

casete de expresión génica comprende un promotor de Ubi-1 de una planta. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, 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, como el promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, unido de forma operativa a un gen indicador o un transgén. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor constitutivo unido de forma operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficacia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficacia en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén de marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor constitutivo puede accionar la expresión de uno o más transgenes o genes indicadores. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor constitutivo puede accionar la expresión de dos o más transgenes o genes indicadores.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, 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, como el promotor corriente arriba de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, unido de forma operativa a un gen indicador o un transgén. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor corriente arriba constitutivo unido de forma operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficacia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficacia en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén de marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor corriente arriba constitutivo puede accionar la expresión de uno o más transgenes o genes indicadores. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor corriente arriba constitutivo puede accionar la expresión de dos o más transgenes o genes indicadores. 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 unida de forma operativa a un gen indicador 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 unida de forma operativa a un gen indicador o transgén. En aun otra modalidad, el promotor corriente arriba puede comprender una 5'-UTR o secuencia líder y una secuencia de intrón. En una modalidad, el promotor corriente arriba puede comprender una 5'-UTR o secuencia líder y una secuencia de intrón unidas de forma operativa a un gen indicador o transgén.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, 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 Ubiquitina-1 unida de forma operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 o un promotor que se proviene de una planta (p. ej., promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays*), un virus (p. ej., un promotor del virus del mosaico venoso en Cassava) o una bacteria (p. ej., *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR o secuencia líder de *Z. mays* c.v. B104 de un gen de maíz que codifica una proteína Ubiquitina unido de forma operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficacia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficacia en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén de marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, 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 de maíz que codifica una proteína Ubiquitina-1 unida de forma operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 o un promotor que proviene de una planta (p. ej., promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays*), un virus (p. ej., un promotor del virus del mosaico venoso en Cassava) o una bacteria (p. ej., *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un intrón de un gen de maíz que codifica una proteína Ubiquitina unido de forma operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficacia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficacia en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén de marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, un vector puede comprender un casete de expresión génica como se describe en la presente. En una modalidad, un vector puede ser un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un bacteriófago, un virus o un fragmento de polinucleótido suprimido para uso en transformación directa o direccionamiento génico, como un ADN donante.

En una modalidad, una célula o planta comprende un casete de expresión génica como se describe en la presente. En una modalidad, una célula o planta comprende un vector que comprende un casete de expresión génica 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. De esta forma, 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, 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, de modo no taxativo, soja, algodón, girasol o canola. Una modalidad también incluye una semilla transgénica de una planta transgénica, como se describe en la presente.

Marcadores seleccionables

Se pueden incorporar diversos marcadores seleccionables, también descritos como genes indicadores, en un vector de expresión seleccionado para permitir la identificación y selección de plantas transformadas ("transformantes"). Hay muchos métodos disponibles para confirmar la expresión de marcadores seleccionables en plantas transformadas, incluyendo, por ejemplo, secuenciación de ADN y reacción de cadena de polimerasa (PCR), transferencia Southern, transferencia de ARN, métodos inmunológicos para detección de una proteína expresada de un vector, como una proteína precipitada que media la resistencia a la fosfotricina u observación visual de otras proteínas como genes indicadores que codifican β -glucuronidasa (GUS), luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), DsRed, β -galactosidasa, cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), fosfatasa alcalina y similares (Ver Sambrook *et ál.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001, cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia).

Los genes de marcadores seleccionables se utilizan para selección de tejidos o células transformadas. Los genes de marcadores seleccionables incluyen genes que codifican resistencia a antibióticos, como los que codifican la neomicina fosfotransferasa II (NEO) y la higromicina fosfotransferasa (HPT), así como genes que confieren resistencia a compuestos herbicidas. Los genes de resistencia a herbicidas generalmente codifican una proteína diana modificada insensible al herbicida o una enzima que degrada o detoxifica el herbicida en la planta antes de que pueda actuar. Por ejemplo, se ha obtenido resistencia al glifosato usando genes que codifican enzimas diana mutantes, 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Se conocen genes y mutantes de EPSPS y se describen adicionalmente a continuación. La resistencia al amonio de glufosinato, bromoxinilo y 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) se obtuvieron usando genes bacterianos que codifican *pat* o *DSM-2*, una *nitrilasa*, un gen *aad-1* o *aad-12*, que detoxifican los herbicidas respectivos.

En una modalidad, los herbicidas pueden inhibir el punto de crecimiento o meristema, incluyendo imidazolinona o sulfonilurea y genes para la resistencia/tolerancia de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) y acetolactato sintasa (ALS). Los genes de resistencia al glifosato incluyen la 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSP) mutante y genes *dgt-28* mediante la introducción de ácidos nucleicos recombinantes y/o diversas formas de mutagénesis *in vivo* de genes de EPSP naturales, genes de *aroA* y genes de glifosato acetil transferasa (GAT), respectivamente. Los genes de resistencia a otros compuestos de fosfono incluyen genes de BAR de la especie *Streptomyces*, incluyendo *Streptomyces hygroscopicus* y *Streptomyces viridichromogenes* y ácidos piridinoxi o fenoxi propiónicos y ciclohexonas (genes que codifican el inhibidor de ACCasa). Los ejemplos de genes que confieren resistencia a ciclohexanodionas y/o ácido ariloxifenoxipropanoico (incluyendo Haloxyfop, Diclofop, Fenoxypop, Fluazifop, Quizalofop) incluyen genes de la coenzima de acetilo A carboxilasa (ACCasa)--Acc1-S1, Acc1-S2 y Acc1-S3. En una modalidad, los herbicidas pueden inhibir la fotosíntesis, incluyendo triazina (genes *psbA* y *1s+*) o benzonitrilo (gen de nitrilasa).

En una modalidad, los genes marcadores seleccionables incluyen, de modo no taxativo, genes que codifican: fosfotransferasa de neomicina II, hidratasa de cianamida, aspartato cinasa, dihidrodipicolinato sintasa, triptófano decarboxilasa, dihidrodipicolinato sintasa y aspartato cinasa desensibilizada, gen de bar, triptófano decarboxilasa, neomicina fosfotransferasa (NEO), higromicina fosfotransferasa (HPT o HYG), dihidrofolato reductasa (DHFR), fofinotricina acetiltransferasa, ácido 2,2-diclopropiónico dehalogenasa, acetohidroxiácido sintasa, 5-enolpiruvil-

shiquimato-fosfato sintasa (aroA), haloarinitrilasa, acetil-coenzima A carboxilasa, dihidropteroato sintasa (sul I) y polipéptido fotosistema II (psbA) de 32 kD.

Una modalidad también incluye genes que codifican la resistencia a: cloramfenicol, metotrexato, higromicina, espectinomina, bromoxinilo, glifosato y fosfotricina.

La lista de genes de marcadores seleccionables precedente no pretende ser taxativa. Todo gen informante o seleccionable está comprendido en la presente invención.

Los genes de marcadores seleccionables se sintetizan para una óptima expresión en plantas. Por ejemplo, en una modalidad, una secuencia codificante de un gen se modificó mediante optimización de codones para potenciar la expresión en plantas. Se puede optimizar un gen marcador seleccionable para expresión en una especie vegetal particular o, de forma alternativa, se puede modificar para expresión óptima en plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas. Los codones preferidos por las plantas se pueden determinar a partir de codones de la mayor frecuencia en proteínas expresadas en la mayor cantidad en la especie vegetal particular de interés. En una modalidad, se diseña un gen marcador seleccionable para su expresión en plantas a un nivel mayor, lo cual produce mayor eficacia de la transformación. Se conocen los métodos para optimización vegetal de genes. Se puede encontrar una guía sobre la optimización y fabricación de secuencias de polinucleótidos sintéticos, por ejemplo, en WO2013/016546, WO2011/146524, WO1997/013402, patente estadounidense n.º 6,166,302 y la patente estadounidense n.º 5,380,831 incorporados en la presente mediante esta referencia.

Transgenes

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

En una modalidad, el elemento regulador del promotor constitutivo de la presente descripción se combina o une de forma operativa con uno o más genes que codifican secuencias de polinucleótidos que proporcionan resistencia o tolerancia a glifosato, 2,4-D glufosinato u otro herbicida, proporciona resistencia a insectos o enfermedades selectos y/o mejoras nutricionales, mejores características agronómicas, proteínas u otros productos útiles en usos alimenticios, de alimentos, industriales, farmacéuticos u otros. Los transgenes se pueden "apilar" con dos o más secuencias de ácido nucleico de interés dentro de un genoma vegetal. El apilamiento se puede

lograr, por ejemplo, mediante reproducción vegetal convencional usando dos o más eventos, transformación de una planta con una construcción que contiene las secuencias de interés, re-transformación de una planta transgénica o adición de nuevos rasgos a través de integración dirigida mediante recombinación homóloga.

Dichas secuencias de polinucleótidos de interés incluyen, de modo no taxativo, los ejemplos que se proporcionan a continuación:

1. Genes o secuencia de codificación (p. ej., ARNi) que confieren resistencia a plagas o enfermedad

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

(B) Una proteína de *Bacillus thuringiensis*, un derivado de la misma o un polipéptido sintético modelado en la misma, como una secuencia de nucleótidos de un gen de Bt d-endotoxina (Geiser et ál., 1986 Gene 48:109) y un gel de insecticida vegetativo (VIP) (ver, p. ej., Estruch et ál. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:5389-94). Adicionalmente, las moléculas de ADN que codifican genes de d-endotoxina se pueden adquirir de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, Md.), con los números de registro de ATCC 40098, 67136, 31995 y 31998.

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

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

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

(F) Una feromona u hormona específica de insectos como una hormona juvenil y ecdisteroide, una variante de la misma, un mimético basado en la misma o un antagonista o agonista de la misma, como la expresión de baculovirus de la hormona juvenil clonada esterasa, un inactivador de la hormona juvenil (Hammock et ál., 1990 *Nature* 344:458).

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

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

(I) Una enzima responsable de una hiperacumulación de monoterpreno, un sesquiterpreno, un esteroide, ácido hidroxámico, un derivado fenilpropanoide u otra molécula que no es proteína con actividad insecticida.

(J) Una enzima implicada en la modificación, incluyendo la modificación pos-traducción, de una molécula biológicamente activa, por ejemplo, enzima glicolítica, una enzima proteolítica, una enzima lipolítica, una nucleasa, una ciclasa, una transaminasa, una esterasa, una hidrolasa, una fosfatasa, una cinasa, una fosforilasa, una polimerasa, una elastasa, una quitinasa y una glucanasa, ya sean naturales o sintéticos. Los ejemplos de dichos genes incluyen un gen de callos (solicitud publicada PCT WO93/02197), secuencias que codifican quitinasa (que se pueden obtener, por ejemplo, de la ATCC con los números de registro 3999637 y 67152), quitinasa de anquilostroma del tabaco (Kramer et ál., 1993 *Insect Molec. Biol.* 23:691) y el gen de poliubiquitina ubi4-2 del perejil (Kawalleck et ál., 1993 *Plant Molec. Biol.* 21:673).

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

(L) Un péptido del momento hidrofóbico. Ver las patentes estadounidenses n.º 5,659,026 y 5,607,914, la última de las cuales describe péptidos antimicrobianos sintéticos que confieren resistencia a enfermedades.

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

(N) Una proteína viral-invasiva o una toxina compleja derivada de la misma. Por ejemplo, la acumulación de proteínas de envoltura viral en células vegetales transformadas imparte resistencia a infección viral y/o desarrollo de enfermedades causadas por el virus del cual se deriva la proteína de envoltura, así como mediante virus relacionados. Se le ha conferido resistencia mediada por proteínas de envoltura viral a plantas transformadas contra el virus del mosaico en la alfalfa, virus del mosaico en el pepino, virus de la raya del tabaco, virus X de la papa, virus Y de la papa, virus del grabado del tabaco, virus rattle del tabaco y virus del mosaico del tabaco. Véase, por ejemplo, Beachy et ál. (1990) Ann. Rev. Phytopathol. 28:451.

(O) Un anticuerpo específico del insecto o una inmunotoxina derivada del mismo. Por lo tanto, un anticuerpo dirigido a una función metabólica crítica en el intestino del insecto inactivaría una enzima afectada, matando al insecto. Por ejemplo, Taylor et ál. (1994) Resumen #497, Séptimo Simposio Internacional sobre Interacciones Moleculares entre 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 que detiene el avance producida en la naturaleza por un patógeno o un parásito. Por lo tanto, las endo α -1,4-D poligalacturonasas fúngicas facilitan la colonización fúngica y la liberación de nutrientes vegetales mediante la solubilización de la pared de células vegetales homo- α -1,4-D-galacturonasa (Lamb et ál., 1992) Bio/Technology 10:1436. La clonación y caracterización de un gen que codifica una proteína que inhibe la endopoligalacturonasa del frijol se describe en Toubart et ál. (1992 Plant J. 2:367).

(R) Una proteína que detiene el desarrollo producida en la naturaleza mediante una planta, como el gen que inactiva el ribosoma de cebada que proporciona una mayor resistencia a la enfermedad fúngica (Longemann et ál., 1992). Bio/Technology 10:3305.

(S) Interferencia de ARN, donde la molécula de ARN se utiliza para inhibir la expresión de un gen diana. Una molécula de ARN en un ejemplo es total o parcialmente bicatenaria, lo cual desencadena una respuesta de silenciamiento, que produce una escisión de ARNdc en ARN

pequeños interferentes, que luego se incorporan a un complejo de direccionamiento que destruye ARNm homólogos. Ver, 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 meristema, como un herbicida de imidazalinona, sulfonilida o sulfonilurea. Los ejemplos de genes en esta categoría codifican la acetolactato sintasa (ALS) mutante (Lee et ál., 1988 EMBOJ. 7:1241) también conocida como enzima de acetohidroxilato sintasa (AHAS) (Miki et ál., 1990 Theor. Appl. Genet. 80:449).

(B) Uno o más genes adicionales que codifican resistencia o tolerancia al glifosato impartida por genes de *aroA* y EPSP sintasa mutante o a través de la inactivación metabólica mediante genes como DGT-28, 2mEPSPS, GAT (acetiltransferasa de glifosato) o GOX (oxidasa de glifosato) y otros compuestos de fosfono, como glufosinato (genes *pat*, *bar* y *dsr-2*) y ácidos ariloxifenoxipropiónico y ciclohexanodionas (genes que codifican el inhibidor de ACCasa). Ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4,940,835 que describe la secuencia de nucleótidos de una forma de EPSP que puede conferir resistencia a glifosato. Se puede obtener una molécula de ADN que codifica un gen de *aroA* mutante con el número de registro de la ATCC 39256 y se describe una secuencia de nucleótidos del gen mutante en la patente estadounidense n.º 4,769,061. La solicitud de patente europea n.º 0 333 033 y la solicitud estadounidense n.º 4,975,374 describen las secuencias de nucleótidos de genes de glutamina sintetasa que confieren resistencia a herbicidas como 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 describen la producción de plantas transgénicas que expresan genes *bar* quiméricos que codifican la actividad de la fosfinotricin-acetil transferasa. Los ejemplos de genes que confieren resistencia a ácidos ariloxifenoxipropiónicos y ciclohexanodionas, como setoxidim y haloxifop, son los genes *Accl-S1*, *Accl-S2* y *Accl-S3* descritos por Marshall et ál. (1992) Theor. Appl. Genet. 83:435.

(C) Genes que codifican resistencia o tolerancia a un herbicida que inhibe la fotosíntesis, como una triazina (genes *psbA* y *gs+*) y benzonitrilo (gen de nitrilasa). Przibilla et ál. (1991) Plant Cell 3:169 describen el uso de plásmidos que codifican genes *psbA* mutantes para transformar *Chlamydomonas*. Las secuencias de nucleótidos para genes de nitrilasa se describen en la patente estadounidense n.º 4,810,648 y las moléculas de ADN que contienen estos genes se

encuentran disponibles con los números de registro de la ATCC 53435, 67441 y 67442. La clonación y expresión de ADN que codifica una glutatona S-transferasa es descrita por Hayes et ál. (1992) *Biochem. J.* 285:173.

(D) Genes que codifican resistencia o tolerancia a un herbicida que se une a hidroxifenilpiruvato dioxigenasas (HPPD), enzimas que catalizan la reacción donde se transforma el para-hidroxifenilpiruvato (HPP) en homogentisato. Esto incluye herbicidas como isoxazoles (EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, patente estadounidense n.º 5,424,276), en particular isoxaflutol, que es un herbicida selectivo del maíz, diquénitilos (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 una superabundancia de HPPD en plantas puede proporcionar tolerancia o resistencia a dichos herbicidas, incluyendo, por ejemplo, genes descritos 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) Genes que codifican resistencia o tolerancia a herbicidas de fenoxi auxina, como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y que también pueden conferir resistencia o tolerancia a herbicidas de ariloxifenoxipropionato (AOPP). Los ejemplos de dichos genes incluyen el gen de la enzima de dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (aad-1), descrito en la solicitud de patente n.º 7,838,733.

(F) Genes que codifican resistencia o tolerancia a herbicidas de fenoxi auxina, como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y que también pueden conferir resistencia o tolerancia a herbicidas de piridiloxi auxina, como fluoroxipir o triclopir. Los ejemplos de dichos genes incluyen el gen de la enzima de dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (aad-12), descrito en WO2007/053482 A2.

(G) Genes que codifican resistencia o tolerancia a dicamba (ver, p. ej., la publicación de patente estadounidense n.º 20030135879)

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

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

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

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

(B) Menor contenido de fitasa

(1) La introducción de un gen que codifica fitasa, como el gen de fitasa de *Aspergillus niger* (Van Hartingsveldt et ál., 1993 Gene 127:87), potencia la descomposición de fitato, agregando más fosfato libre a la planta transformada.

(2) Se podría introducir un gen que reduzca el contenido de fitato. En el maíz, por ejemplo, esto se podría lograr clonando y luego reintroduciendo ADN asociado con el único alelo responsable de los mutantes de maíz caracterizado por niveles bajos de ácido fítico (Raboy et ál., 1990 Maydica 35:383).

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

Transformación

Los métodos adecuados para la transformación de plantas incluyen cualquier método donde se pueda introducir ADN en una célula, por ejemplo y de modo no taxativo: electroporación (*ver, p. ej.*, la patente estadounidense n.º. 5,384,253); bombardeo con micro-proyectiles (*ver, p. ej.*, las patentes estadounidenses n.º. 5,015,580; 5,550,318; 5,538,880; 6,160,208; 6,399,861 y 6,403,865); transformación mediada por *Agrobacterium* (*ver, p. ej.*, las patentes estadounidenses n.º. 5,635,055; 5,824,877; 5,591,616; 5,981,840 y 6,384,301) y transformación de protoplastos (*ver, p. ej.*, la patente estadounidense n.º. 5,508,184). Estos métodos se pueden utilizar para transformar de forma estable o transformar de forma transitoria una planta.

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

Adicionalmente, la transferencia génica se puede lograr usando virus o bacterias que no sean *Agrobacterium* como *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, virus X de la papa, virus del mosaico del coliflor y virus del mosaico venoso en Cassava y/o virus del mosaico del tabaco. *Ver, p. ej.*, Chung *et ál.* (2006) *Trends Plant Sci.* 11(1):1-4.

Mediante la aplicación de técnicas de transformación, se pueden transformar de forma estable las células de virtualmente cualquier planta y estas células se pueden desarrollar en plantas transgénicas 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; se describen en particular técnicas para transformar plantas de *Brassica*, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5,750,871; se describen técnicas para transformar soja, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6,384,301, y se describen técnicas para transformar el maíz, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 7,060,876 y 5,591,616 y la solicitud PCT internacional WO95/06722.

Luego de realizar la administración de un ácido nucleico exógeno a una célula receptora, se identifica generalmente la célula transformada para el cultivo y la regeneración vegetal adicionales. Para mejorar la capacidad de identificar transformantes, se puede desear utilizar un gen de marcador seleccionable con el vector de transformación utilizado para generar el transformante. En una modalidad ilustrativa, se puede analizar una población celular transformada exponiendo las células a un agente o agentes selectivos, o las células se pueden clasificar en función del rasgo génico marcador deseado.

Las células que sobreviven a la exposición a un agente selectivo o las células que se calificaron positivas en un ensayo de clasificación se pueden cultivar en medio que permita la regeneración de plantas. En una modalidad, se puede modificar cualquier medio de cultivo de tejidos vegetales adecuado incluyendo sustancias adicionales, como reguladores de crecimiento. Los

tejidos vegetales se pueden mantener en un medio básico con reguladores de crecimiento hasta que se logra suficiente tejido disponible para comenzar los intentos de regeneración vegetal. De forma alternativa, siguiendo rondas repetidas de selección manual hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración (p. ej., al menos 2 semanas), el tejido luego se puede transferir a medio conductivo para formar brotes. Los cultivos se transfieren de forma periódica hasta que se produce una formación de brotes suficiente. Luego de formarse los brotes, estos se transfieren a medio conductivo para formar raíces. Luego de haberse formado suficientes raíces, las plantas se pueden transferir al suelo para un mayor crecimiento y madurez.

Para confirmar la presencia de un ácido nucleico deseado que comprende construcciones proporcionadas en plantas que se regeneran, se pueden realizar diversos ensayos. Dichos ensayos pueden incluir: ensayos de biología molecular, como transferencia Southern y Northern y PCR, ensayos bioquímicos, como detección de la presencia de un producto de proteína a través de medios inmunológicos, como ELISA, transferencias Western y/o espectrofotometría MS LC-MS) o mediante función enzimática, como mediante ensayos de partes vegetales, como ensayos de hojas, callos o polen, y/o análisis del fenotipo de la planta regenerada entera.

Los eventos transgénicos se pueden analizar, por ejemplo, mediante amplificación PCR usando cebadores de oligonucleótidos específicos para las moléculas de ácido nucleico de interés. Se entiende que la determinación de genotipos de PCR incluye, de modo no taxativo, amplificación PCR de ADN genómico derivado de tejido vegetal hospedador aislado y/o purificado que se prevé que contiene una molécula de ácido nucleico de interés integrada al genoma, seguida por clonación estándar y análisis de secuencia de productos de amplificación PCR. Los métodos de determinación de genotipos de PCR se encuentran bien descritos (*ver, p. ej., Rios et ál. (2002) Plant J. 32:243-53*) y se pueden aplicar a ADN genómico derivado de cualquier especie vegetal o tipo de tejido, incluyendo cultivos celulares.

Las combinaciones de cebadores de oligonucleótidos que se unen tanto a la secuencia diana y la secuencia introducida se pueden utilizar de forma secuencial o múltiple en reacciones de amplificación de PCR. Se pueden producir cebadores de oligonucleótidos diseñados para hibridarse al sitio diana, secuencias de ácido nucleico introducidas y/o combinaciones de los dos tipos de secuencias de ácido nucleico. Por lo tanto, las estrategias de determinación de genotipos de PCR pueden incluir, por ejemplo y de modo no taxativo: amplificación de secuencias específicas en el genoma vegetal, amplificación de secuencias múltiples específicas en el genoma vegetal, amplificación de secuencias no específicas en el genoma vegetal y combinaciones de cualquiera de

los anteriores. El experto en la técnica podrá concebir combinaciones adicionales de cebadores y reacciones de amplificación para cuestionar al genoma. Por ejemplo, se puede diseñar un conjunto de cebadores de oligonucleótidos directos o inversos para hibridarse a secuencia/s de ácido nucleico para la diana fuera de los límites de la secuencia de ácido nucleico introducida.

Se pueden diseñar cebadores de oligonucleótidos directos o inversos para hibridarse específicamente a una molécula de ácido nucleico introducida, por ejemplo, en una secuencia que corresponde a una región de codificación dentro de una secuencia de nucleótidos de interés allí comprendida u otras partes de la molécula de ácido nucleico. Se pueden utilizar cebadores en conjunto con los cebadores descritos en la presente. Los cebadores de oligonucleótidos se pueden sintetizar de acuerdo con una secuencia deseada y se encuentran comercialmente disponibles (p. ej., de Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA). La amplificación puede estar seguida por clonación y secuenciación o por análisis directo de secuencia de productos de amplificación. En una modalidad, los cebadores de oligonucleótidos específicos para la diana génica se utilizan en amplificaciones PCR.

Método para expresión de un transgén

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende el cultivo de una planta que comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2) unido de forma operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende el cultivo de un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2) unido de forma operativa a al menos un transgén.

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende el cultivo de una planta que comprende un casete de expresión génica que contiene un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2) unido de forma operativa a al menos un transgén. En otra modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende el cultivo de un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de expresión génica que contiene un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2) unido de forma operativa 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 Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2) unido de forma operativa a un transgén. Donde, el promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO:

2) está compuesto por 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 Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (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 Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6), y un intrón (SEQ ID NO: 8) de un gen de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104. En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor corriente arriba de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6), y un intrón (SEQ ID NO: 8) de un gen de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104.

En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104. En una modalidad, un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 puede ser 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, 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 Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, unido de forma operativa 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 Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 unido de forma operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficacia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficacia en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén de marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un promotor corriente arriba de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104. En una modalidad, un promotor corriente arriba de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 puede ser 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, 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: 4. En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor corriente arriba de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, unido de forma operativa 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 Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 unido de forma operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficacia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficacia en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén de marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende una 5'-UTR o secuencia líder de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104. En una modalidad, una 5'-UTR o secuencia líder de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 puede ser un polinucleótido de la SEQ ID NO: 6. En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR o secuencia líder, donde la 5'-UTR o secuencia líder es menos de 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 *Z. mays* c.v. B104 unida de forma operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor de Ubiquitina o un promotor que proviene de una planta (p. ej., promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays*), un virus (p. ej., un promotor del virus del mosaico venoso en Cassava) o una bacteria (p. ej., *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 de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, unido de forma operativa a un transgén. En una modalidad ilustrativa, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR o líder de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 unida de forma operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficacia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficacia en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén de marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un intrón de Ubi-1. En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un intrón de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104. En una modalidad, un intrón de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 puede ser un polinucleótido de la SEQ ID NO: 8. En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un intrón, donde el promotor es menos de 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 *Z. mays* c.v. B104 unido de forma operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor de Ubiquitina o un promotor que proviene de una planta (p. ej., promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays*), un virus

(p. ej., un promotor del virus del mosaico venoso en Cassava) o una bacteria (p. ej., *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 Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, unido de forma operativa a un transgén. En una modalidad ilustrativa, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un intrón de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 unido de forma operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficacia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficacia en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén de marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor-corriente arriba de Ubi-1, intrón de Ubi-1 y 5'-UTR de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 unidos de forma operativa a un transgén. El promotor de Ubi-1, intrón de Ubi-1 y una 5'-UTR de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 se pueden unir de forma operativa 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 Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 unido de forma operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficacia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficacia en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén de marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un intrón de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 unido de forma operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficacia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficacia en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén de marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 unido de forma operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor de Ubiquitina o un promotor que proviene de una planta (p. ej., promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays*), un virus (p. ej., un promotor del virus del mosaico venoso en Cassava) o una bacteria (p. ej., *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 unida de forma operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficacia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficacia en el uso de agua, un transgén de

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

En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un vector que comprende un elemento regulador del promotor génico constitutivo 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 del promotor génico constitutivo tal como se describe en la presente, unido de forma operativa 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 viral.

En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal, de acuerdo con los métodos descritos en la presente, puede ser monocotiledónea. La planta monocotiledónea, tejido vegetal o célula vegetal puede ser, de modo no taxativo, maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, cebada, centeno, sorgo, orquídeas, bambú, banana, totora, lirios avena, cebolla, mijo y tritical. En otra modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal, de acuerdo con los métodos descritos en la presente, puede ser dicotiledónea. La planta dicotiledónea, tejido vegetal o célula vegetal pueden ser, de modo no taxativo, colza, canola, mostaza india, mostaza de Etiopía, soja, girasol y algodón.

Con respecto a la producción de plantas con modificación genética, en la técnica se conocen los métodos para modificación genética de plantas. Por ejemplo, se desarrollaron diversos métodos para transformación vegetal, incluyendo protocolos de transformación biológica y física para plantas dicotiledóneas, así como plantas monocotiledóneas (p. ej., 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 Ratón, pp. 67-88 (1993)). Además, los vectores y métodos de cultivo *in vitro* para transformación de célula o tejido vegetal y regeneración 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 Ratón, pp. 89-119 (1993).

Un experto en la técnica reconocerá que luego de que la secuencia exógena se incorpora de forma estable en plantas transgénicas y se confirma que este se encuentra operativo, este se puede introducir en otras plantas mediante cruzamiento sexual. Se puede utilizar cualquiera de diversas técnicas de reproducción estándar, dependiendo la especie que se desee cruzar.

Se puede identificar y aislar una raíz, hoja, callo, polen, tejido, célula vegetal o planta transformada mediante selección o clasificación del material vegetal modificado para determinar los rasgos codificados por los genes marcadores presentes en el ADN en transformación. Por ejemplo, la selección se puede realizar cultivando el material vegetal modificado en medio con una cantidad inhibidora de un antibiótico o herbicida al cual le confiere resistencia la construcción génica de transformación. Además, las células transformadas también se pueden identificar mediante clasificación según las actividades de cualquier gen marcador visible (p. ej., los genes de YFP, GFP, β -glucuronidasa, Luciferasa, B o C1) que pueden estar presentes en las construcciones de ácido nucleico recombinante. Dichas metodologías de selección y clasificación son muy conocidas por los expertos en la técnica.

Los métodos físicos y bioquímicos también se pueden utilizar para identificar transformantes de células vegetales o plantas que contienen construcciones génicas insertadas. Estos métodos incluyen, de modo no taxativo: 1) Análisis Southern o amplificación por PCR para detectar y determinar la estructura del inserto de ADN recombinante, 2) transferencia Northern, protección de RNasa S1, extensión de cebadores o amplificación de PCR-transcriptasa inversa para detectar y examinar transcritos 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 última generación (NGS), o 5) electroforesis en gel de proteína, técnicas de transferencia Western, inmunoprecipitación o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), donde los productos de la construcción génica son proteínas. También se pueden utilizar técnicas adicionales, como hibridación *in situ*, tinción enzimática e inmunotinción, para detectar la presencia o expresión de la construcción recombinante en tejidos y órganos vegetales específicos. Los expertos en la técnica conocen los métodos para realizar todos estos ensayos.

Los efectos de la manipulación génica utilizando los métodos descritos en la presente se pueden observar, por ejemplo, mediante transferencias Northern del ARN (p. ej., ARNm) aislado de los tejidos de interés. Típicamente, si el ARNm está presente o aumentó la cantidad de ARNm, se puede asumir que se está expresando el transgén correspondiente. Se pueden utilizar otros métodos para medir la actividad de genes y/o polipéptido codificado. Se pueden utilizar diferentes tipos de ensayos enzimáticos, dependiendo del sustrato utilizado y los métodos para detectar el aumento o la disminución de un producto o subproducto de reacción. Además, los niveles de polipéptido expresado se pueden medir de forma inmunoquímica, utilizando ELISA, RIA, EIA y otros ensayos basados en anticuerpos muy conocidos por los expertos en la técnica,

como mediante ensayos de detección electroforética (con tinción o transferencia Western). Como ejemplo no taxativo, la detección de las proteínas AAD-1 (ariloxialcanoato dioxigenasa, ver WO 2005/107437) y PAT (fosfinotricina-N-acetil-transferasa) usando un ensayo ELISA se describe en la publicación de patente estadounidense n.º 20090093366, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. El transgén también se puede expresar de forma selectiva en algunos tipos celulares o tejidos de la planta o en algunas etapas del desarrollo. El transgén también se puede expresar sustancialmente en todos los tejidos vegetales y a lo largo de todo el ciclo vital. No obstante, también se puede aplicar cualquier modo de expresión combinatoria.

La presente descripción también comprende semillas de las plantas transgénicas descritas anteriormente, donde la semilla comprende el gen informante, transgén o casete de expresión génica. La presente descripción comprende adicionalmente la progenie, clones, líneas celulares o células de las plantas transgénicas precedentes, donde dicha progenie, clon, línea celular o célula comprende el gen informante, transgén o construcción génica.

Si bien se describió la invención con referencia a métodos y modalidades específicos, se debe apreciar que pueden realizarse diversas modificaciones y cambios sin alejarse de la invención descrita en la presente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación y aislamiento del promotor novedoso

Se amplificó una secuencia del promotor novedoso del gen de Ubi-1 de *Zea mays* c.v. B104 usando reacción de cadena de polimerasa (PCR). Se derivaron oligonucleótidos (Tabla 1) diseñados para amplificar el promotor novedoso, *Z. mays* c.v. B104, de regiones conservadas de la secuencia del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73, que se utilizó como control. Se obtuvo y caracterizó un producto de PCR de *Z. mays* c.v. B104.

El producto de PCR que comprende el promotor novedoso se clonó en vectores Topo™ usando el kit de clonación por PCR Zero Blunt® TOPO® de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se proporciona un mapa del vector que muestra el plásmido clonado que comprende el producto de PCR del promotor novedoso. El plásmido pDAB105712 corresponde a *Z. mays* c.v. B104 (FIG. 2).

Tabla 1: Cebadores utilizados para amplificación PCR de promotores de Ubi-1 novedosos	
Cebador directo: GCTACCGCGG <u>ACCCGGTCGTGCCCCCTCTCTAGAGATAATG</u>	Seq. ID NO: 9
Cebador inverso: AGTCAGGTACCCTGCAGAAGTAACACCAAACAACAG	10
La secuencia específica del promotor de los cebadores de PCR se encuentra subrayada. La secuencia del cebador ubicada 5' corriente arriba de la secuencia específica del promotor es la secuencia enlazadora que se utiliza para la clonación.	

Luego de la clonación, el inserto del promotor que contiene el producto de PCR se secuenció usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las secuencias de polinucleótidos del promotor de *Z. mays* c.v. B104 (FIG. 4) se alinearon de manera informática y luego se analizaron para determinar la homología de secuencia con la secuencia de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIG. 3). Se utilizaron programas de software y/o métodos bioinformáticos conocidos por los expertos en la técnica, como ClustalW o Sequencher, para realizar el análisis de homología de secuencia.

Ejemplo 2: Caracterización del promotor novedoso

El análisis de homología de secuencia (FIGS. 3-7) que incluye alineación de secuencia y comparación con la secuencia de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (SEQ ID NO: 1, FIG. 3) reveló un promotor de Ubi-1 novedoso para caracterización adicional. También se observó que una nueva secuencia del promotor de Ubi-1, obtenida de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2, FIG. 4) comprendía secuencias de polinucleótidos de tres regiones distintas, 1) una región del promotor corriente arriba (SEQ ID NO: 4), 2) una 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) y 3) un intrón (SEQ ID NO: 8). Se analizaron las regiones del promotor y elementos del promotor específicos de *Z. mays* c.v. B104 para determinar la homología de secuencia con la secuencia de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIGS. 5-7). De manera más específica, se realizó alineación de secuencia para comparar de forma independiente el promotor corriente arriba, 5'-UTR y regiones intrónicas, así como los elementos reguladores de la caja TATA y el elemento de choque término (HSE) del promotor de *Z. mays* c.v. B104 con las regiones correspondientes de la secuencia de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIGS. 5-7 Tabla 2).

Tabla 2: Homología de secuencia (%) entre el promotor de Ubi-1 de <i>Z. mays</i> c.v. B73 y el promotor de Ubi-1 novedoso						
Promotor	Total	Promotor corriente arriba	5'-UTR/líder	Intrón	Caja TATA	Elemento de choque térmico
<i>Z. mays</i> c.v. B104	85,7	93,4	96,4	78,2	100	100

La FIG. 5 muestra la alineación de la secuencia de las regiones del promotor corriente arriba del promotor de *Z. mays* c.v. B104 en comparación con la región del promotor corriente arriba de la secuencia del promotor de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. La FIG. 6 muestra la alineación de secuencia de la 5'-UTR o secuencia líder del promotor de *Z. mays* c.v. B104 en comparación con la región 5'-UTR o secuencia líder de la secuencia del promotor de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. La FIG. 7 muestra la alineación de la secuencia de las regiones intrónicas del promotor de *Z. mays* c.v. B104 en comparación con la secuencia intrónica de la secuencia del promotor de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73.

Los elementos del promotor obtenidos de *Z. mays* c.v. B104 mostraron una identidad de secuencia general del 85,7 % (Tabla 2) con respecto a la secuencia de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. La caracterización de la secuencia del promotor novedoso de *Z. mays* c.v. B104 conformó que la mayoría de los elementos reguladores del promotor (es decir, una caja TATA o elemento de choque térmico) que se encuentran típicamente en un promotor funcional, también se conservaron en gran medida dentro de las regiones del promotor central del promotor de *Z. mays* c.v. B104 (Tabla 2). Por ejemplo, la FIG. 5 muestra una caja TATA altamente conservada (los pares de bases 869-876 se muestran en cursiva y subrayados) que se identificó y descubrió que se encontraba aproximadamente 50 pb 5' corriente arriba del TSS en la región del promotor corriente arriba del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 novedoso. De manera similar, la FIG. 5 muestra dos secuencias del elemento de choque térmico (HSE) superpuestas (pares de bases 457-481 que se muestran subrayados y 482-500 que se muestran doblemente subrayados, respectivamente) se conservaron en el promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 novedoso analizado en este estudio y se ubicaron aproximadamente 200 pb 5' corriente arriba del TSS.

Si bien solamente se observaron niveles pequeños de variación en la secuencia 5'-UTR o líder del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 novedoso en comparación con la secuencia de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIG. 6), también se identificaron áreas de menor

conservación de secuencia en la región del promotor corriente arriba (FIG. 5) y la región del intrón (FIG. 7). De hecho, la mayor parte de la variación de secuencia en el promotor de *Z. mays* c.v. B104 la contribuyó específicamente la secuencia del intrón, lo cual mostró solamente un 78,2 % de similitud de secuencia con el intrón de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIG. 7, Tabla 2). En particular, un procesamiento de 310 pb de polinucleótidos ubicados en el extremo 5' del intrón de *Z. mays* c.v. B104 fue la más diversa (pares de bases 30-340), mientras que se descubrió que el extremo 3' del intrón se encontraba bastante conservado (FIG. 7). Por el contrario, las regiones del promotor corriente arriba y 5'-UTR del promotor de *Z. mays* c.v. B104 se encontraron relativamente conservadas (FIGS. 5 y 6), con 93,4 % y 96,4 % de identidad de secuencia con el promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73, respectivamente (Tabla 2).

Además, existen motivos reguladores adicionales en la región del promotor corriente arriba de Ubi-1 que se extiende de 100-200 pb 5' corriente arriba del TSS. Estos motivos se unen a factores de transcripción que interactúan con el complejo de inicio de transcripción y facilitan su ensamblaje, mejoran la estabilidad o mejoran la eficacia del escape del promotor luego de comenzar la maquinaria de transcripción (PEREMARTI *et al.* 2010). Por lo tanto, las eliminaciones, sustituciones y errores de emparejamiento dentro de esta región reguladora podrían llegar a afectar tanto la potencia como la especificidad del promotor.

Ejemplo 3: Construcción de vector utilizando los nuevos promotores para expresión génica

Salvo que se indique lo contrario, se realizaron manipulaciones de bioquímica y biología molecular descritas en el presente Ejemplo y ejemplos posteriores mediante metodologías estándar como se describe, por ejemplo, en Ausubel *et ál.* (1995 y Sambrook *et ál.* (1989) y actualizaciones de los mismos. Las construcciones utilizadas en los experimentos se describen a continuación en más detalle (Tabla 3).

Los promotores de *Z. mays* que comprenden el promotor corriente arriba, 5'-UTR y regiones intrónicas, como se describió anteriormente, se extrajeron del gen de Ubi-1 de la especie *Z. mays* y los amplicones de la PCR se purificaron en gel usando el QIAquick Gel Extraction Kit® (Qiagen Carlsbad, CA). La secuencia de polinucleótidos del promotor luego se clonó en un Gateway Entry Vector® (Invitrogen) usando técnicas de clonación estándar conocidas en la técnica. El Gateway Entry Vector® resultante comprende la secuencia del promotor de Ubi-1 para *Z. mays* c.v. B104 se confirmó mediante digestión de restricción y secuenciación. También se clonó un vector de entrada de control que comprende la secuencia

del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v B73 en un Gateway Entry Vector usando técnicas de clonación estándar conocidas en la técnica.

Además de las secuencias del promotor de Ubi-1, el vector de entrada también comprendía el gen informante de la *proteína fluorescente amarilla* de la especie *Phialidium* (*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 de 3'-UTR del gen de peroxidasa 5 de *Zea mays* (*ZmPer5*; patente estadounidense n.º 6,699,984). Se proporcionan mapas del vector que muestran los vectores de entrada clonados que comprenden cada una de las secuencias del promotor. La construcción pDAB105742 corresponde al vector de entrada de control que comprende la secuencia del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. La construcción pDAB105739 corresponde al vector de entrada que comprende la secuencia del promotor de Ubi-1 de *Z. mays*. B104. Por lo tanto, se establecieron los vectores de entrada que comprenden casetes de expresión génica que comprenden un promotor de Ubi-1 de *Z. mays*, el gen de *PhiYFP* y la 3'-UTR de *ZmPer5*.

Tal como se describe en la Tabla 3, se construyó una construcción del vector de expresión, que comprende el gen informante de *PhiYFP* impulsado por la nueva secuencia del promotor y terminado por la 3'-UTR de *ZmPer5*. Los vectores de expresión o transformación para la transformación del embrión de maíz mediado por *Agrobacterium* se construyeron mediante el uso de métodos de clonación estándar y reacciones de recombinación de Gateway® utilizando un vector binario de destino estándar, pDAB101917, y los vectores de entrada que comprenden los casetes de expresión génica, tal como se describió anteriormente.

El vector de destino binario, pDAB101917, comprendía un gen de tolerancia a herbicidas, *fosfinotricina acetiltransferasa* (PAT; Wehrmann *et ál.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14:1274-1278). En el vector pDAB101917, la expresión del gen PAT se encontraba controlada por una 5'-UTR, un intrón y promotor de Ubi-1 de *Z. mays*. El vector pDAB101917 también comprendía una región 3'-UTR del gen de lipasa de *Z. mays* (*ZmLip*; patente estadounidense n.º 7,179,902). La 3'-UTR de *ZmLip* se utilizó para finalizar la transcripción del ARNm de PAT. La reacción de recombinación de Gateway® permitió la inserción de cada vector de entrada que comprendía el casete de expresión génica (es decir, un promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 o *Z. mays* c.v. B73, el gen *PhiYFP* y el 3'-UTR de *ZmPer5*) en el vector binario de destino pDAB101917. Se insertaron los vectores de entrada en el vector de destino pDAB101917 entre los límites de ADN-T A y B y corriente arriba del casete de expresión de PAT.

Tabla 3: Construcción del vector de expresión génica binario							
Construcción del vector binario	Construcción del vector de entrada			Construcción del vector de destino			Figura
	Promotor	Transgén	3'-UTR	Promotor	Gen informante	3'-UTR	
pDAB105748	Ubi-1 de <i>Z. mays</i> c.v. B73	<i>PhiYFP</i>	<i>ZmPer5</i>	Ubi-1 de <i>Z. mays</i>	PAT	<i>ZmLip</i>	8
pDAB105745	Ubi-1 de <i>Z. mays</i> c.v. Ubi-1 de B104	<i>PhiYFP</i>	<i>ZmPer5</i>	Ubi-1 de <i>Z. mays</i>	PAT	<i>ZmLip</i>	9

Se proporcionan mapas del vector que muestran la construcción de expresión binaria, pDAB101917, con los casetes de expresión génica que comprenden un promotor de Ubi-1 de *Z. mays*, el gen de *PhiYFP* y la 3'-UTR de *ZmPer5* incorporados. La construcción de control, pDAB105748, corresponde al casete de expresión génica, que comprende el promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIG. 8). Además, la construcción pDAB105748 corresponde al casete de expresión génica, que comprende la secuencia del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (FIG. 9).

Ejemplo 4: Transformación vegetal

Se transformó cada una de las construcciones del vector binario, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73) y pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104), en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA101, usando técnicas de transformación estándar conocidas en la técnica. Se aislaron colonias bacterianas y se extrajo el ADN del plásmido binario, se purificó y confirmó mediante digestión de la enzima de restricción.

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

Los resultados de la transformación para las construcciones de expresión génica individual se describen adicionalmente en la Tabla 4. Se describen la cantidad total de embriones producidos, la cantidad total de eventos transgénicos observados en la etapa de callo y en la planta total, así como el porcentaje de eficacia general de la transformación. La eficacia general de la transformación de las construcciones de expresión binaria es menor a lo indicado previamente (Vega et ál., 2008) debido al poco vigor del embrión en muchos experimentos.

Tabla 4: Resultados de la transformación de maíz de primera ronda, T₀				
Construcción del vector binario	Cantidad total de embriones	Cantidad de callos	Cantidad de eventos transgénicos	Eficacia (%)
pDAB105748	545	221	33	6,1
pDAB105745	454	227	25	5,5

Ejemplo 5: Análisis de la cantidad de copias del transgén

La integración estable del transgén de *PhiYFP* dentro del genoma de las plantas de *Z. mays* transgénicas se confirmó mediante un ensayo con sonda de hidrólisis. Se obtuvieron plántulas de *Z. mays* transgénico con transformación estable que se desarrollaron de callos y se analizaron para identificar eventos que contenían una cantidad baja de copias (es decir 1-2 copias) de los insertos de cadena T de longitud completa.

Se utilizó el sistema Light Cycler 480™ de Roche para determinar la cantidad de copias transgénicas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El método utilizó una reacción PCR doble TaqMan® que utilizó oligonucleótidos específicos del gen de *PhiYFP* y del gen endógeno de referencia, invertasa de *Z. mays* (*ZmInv*; registro de Genbank n. °: U16123.1), en un único ensayo. La cantidad de copias y a cigocidad se determinaron midiendo la intensidad de fluorescencia específica de *PhiYFP*, con relación a la fluorescencia específica de *ZmInv*, en comparación con los estándares de cantidad de copias conocidos.

Se amplificó un fragmento de ADN específico del gen de *PhiYFP* con un conjunto de cebador/sonda TaqMan® con una sonda etiquetada con el tinte fluorescente FAM™ y se amplificó *ZmInv* con un segundo conjunto de cebador/sonda TaqMan® con una sonda etiquetada con fluorescencia HEX™ (Tabla 5). Los cebadores y las sondas para análisis de cantidad de copias fueron comercialmente sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). El resto fluorescente FAM™ se

excitó a una densidad óptica de 465/510 nm y el resto fluorescente HEX™ se excitó a una densidad óptica de 533/580 nm.

Las reacciones PCR se realizaron en un volumen de reacción final de 10 µl usando reactivos, como se describe en la Tabla 6. Los fragmentos de ADN específicos del gen se amplificaron de acuerdo con las condiciones de termociclación indicadas en la Tabla 7. La cantidad de copias y cigocidad de las muestras se determinó midiendo la intensidad relativa de fluorescencia específica del gen informante, *PhiYFP*, con respecto a la fluorescencia específica para el gen de referencia, *ZmInv*, en comparación con los estándares de cantidad de copias conocidos.

Los estándares de cantidad de copias se crearon diluyendo el vector, pDAB108706, en ADN genómico de *Z. mays* c.v. B104 (ADNg) para obtener estándares con una relación conocida de pDAB108706:ADNg. Por ejemplo, se elaboraron muestras con uno, dos y cuatro copias de ADN del vector por copia de ADNg de *Z. mays* c.v. B104. Se validaron diluciones de una y dos copias de pDAB108706 mezclado con el estándar de ADNg de *Z. mays* c.v. B104 contra un evento de *Z. mays* de control que se sabía que era hemocigoto y un evento de *Z. mays* de control que se sabía que era homocigoto (es decir, evento 278 de *Z. mays*, ver publicación de patente internacional PCR n.º WO 2011/022469 A2).

Se realizó un ensayo de amplificación PCR doble TaqMan® utilizando oligonucleótidos específicos del gen PAT y el gen de referencia *ZmInv* endógeno, respectivamente. Se utilizó amplificación por PCR para detectar un fragmento de ADN específico del gen para PAT con un conjunto de cebadores TaqMan® y una sonda etiquetada con 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 referencia/control endógeno de *ZmInv* (Tabla 5). La mezcla de reacción TaqMan® de PAT se elaboró como se indica en la Tabla 6 y los fragmentos específicos se amplificaron de acuerdo con las condiciones que se indican en la Tabla 7.

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

Tabla 5: Ensayos de cantidad de copias de cebadores y sondas			
Gen	Cebador/Sonda	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID No:
<i>PhiYFP</i>	Cebador directo	CGTGTGGGAAAGAACTTGGA	11
	Cebador inverso	CCGTGGTTGGCTTGGTCT	12
	Sonda (etiqueta fluorescente/secuencia)	5'FAM/CACTCCCCACTGCCT	13
Control de <i>ZmInv</i>	Cebador directo	TGGCGGACGACGACTTGT	14
	Cebador inverso	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT	15
	Sonda (etiqueta fluorescente/secuencia)	5'HEX/CGAGCAGACCGCCGTGTACTT	16
PAT	Cebador directo	ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGT	17
	Cebador inverso	CTTTGATGCCTATGTGACACGTAAACAGT	18
	Sonda (etiqueta fluorescente/secuencia)	5'FAM/GGTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGG	19

Tabla 6: Reactivos de reacción PCR de cantidad de copias Taqman®			
Reactivo	Concentración de trabajo	Volumen (µl)	Concentración final:
Agua	--	0,5	--
Mezcla maestra LightCycler de Roche	2X	5	1X
Cebador directo de <i>PhiYFP</i>	10 µM	0,4	400 nM
Cebador inverso de <i>PhiYFP</i>	10 µM	0,4	400 nM
Sonda de <i>PhiYFP</i> -etiquetada con FAM	5 µM	0,4	200 nM
Cebador directo de <i>ZmInv</i>	10 µM	0,4	400 nM
Cebador inverso de <i>ZmInv</i>	10 µM	0,4	400 nM
Sonda de <i>ZmInv</i> -etiquetada con HEX	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 de termociclación para amplificación por PCR de la cantidad de copias			
Etapas de 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 cantidad de copias transgénicas de plantas transgénicas			
Construcción	Eventos analizados	Simple (1-2 copias)	Complejo (>2 copias)
105748	21	15	6
105745	11	9	2

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

Se tomaron muestras de las plantas en la etapa V4-5 del desarrollo usando ensayos ELISA de hoja. Las muestras se recolectaron en placas con tubos de recolección de 96 pocillos y se tomaron 4 discos de hojas (del tamaño de un perforador de hojas) para cada muestra. Se agregaron a cada tubo dos BB de 4,5 mm (Daisy corporation, Roger, AR) y 200 µL de amortiguador de extracción [1x de PBS complementado con 0,05 % de Tween®-20 y 0,05 % de BSA (Millipore Probumin®, EMD Millipore Corp., Billerica, MA)]. Se agregaron otros 200 µL de amortiguador de extracción a cada tubo seguido por inversión para mezclar. Las placas se giraron a durante 5 minutos a 3000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a los pocillos correspondientes en un pocillo profundo 96 almacenado en hielo. Se utilizaron las placas Maxi-Sorp de 96 pocillos de Nunc® (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) para el ELISA. Las placas se recubrieron con anticuerpo de captura anti-YFP monoclonal de ratón (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD). El anticuerpo se diluyó en PBS (1 µg/mL) y se agregaron 150 µL de PBS diluido por pocillo. Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas de toda la noche se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20-30 minutos antes del lavado 4x con 350 µL de amortiguador de lavado [1x de PBS complementado con 0,05 % de Tween®-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)]. Las placas se bloquearon con 200 µL de amortiguador de bloqueo por pocillo [1x de 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 por 4x de lavado con 350 µL de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash™ 2, Tomtec, Inc., Hamden, CT).

Para el ELISA de YFP, se utilizó Phi-YFP recombinante de Evrogen 1 mg/mL (Axxora LLC, Farmingdale, NY) como estándar. Se utilizó una curva estándar de ajuste de 5 parámetros (entre los estándares de 1 ng/ml y 0,125 ng/ml) para asegurar que todos los datos se encontraran en la parte lineal de la curva. Se agregaron 100 µL de estándar o muestra al pocillo. Se utilizó un mínimo de dilución 1:4 de muestra en el amortiguador del ensayo. Las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador de placas (250 rpm, agitador de placas de

titulación) seguido por 4x de lavado con 350 μ L de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash™ 2). Se agregaron alrededor de 100 μ L de 1 μ g/mL de anticuerpo primario anti-*PhiYFP* policlonal de conejo de Everogen (Axxora) a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador de placas a 250 rpm, seguido por 4x de lavado con 350 μ L de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash™ 2). Luego, 100 μ L de anticuerpo secundario HRP de IgG anti-conejo (Thermo Scientific) se diluyeron 1:5000 en amortiguador de bloqueo/ensayo, donde las proteínas PAT se cuantificaron usando el kit de Envirologix (Portland, ME). Los ELISA se realizaron usando múltiples diluciones de extractos vegetales y los reactivos y las instrucciones esencialmente como las proporcionaron los proveedores.

Ejemplo 7: Expresión vegetal estable de transgenes unidos de forma operativa a promotores novedosos

Se observó la expresión de proteínas en tejidos de plantas transgénicas. Por ejemplo, se observó la expresión de *PhiYFP* en callos de plantas T_0 transformadas de forma estable mediante cultivación conjunta con *Agrobacterium*. Las plantas transgénicas se cultivaron a partir de embriones de *Z. mays* transformados usando las construcciones de vectores binarios con el promotor novedoso, pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104, (FIG. 9) y el promotor de control, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73, FIG. 8). Los callos vegetales se observaron en un estereomicroscopio (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL) usando un filtro de YFP y una fuente de luz de 500 nm. Los ejemplos representativos de la expresión estable de *PhiYFP* observados en los tejidos de callos de plantas de maíz T_0 transgénicas que comprenden pDAB105745 en comparación con el control, pDAB105748, se muestran en la FIG. 10. Los datos confirman que el promotor novedoso que comprende pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104), tal como se describe en la presente, tiene la capacidad de impulsar la expresión fuerte del gen de *PhiYFP* en tejidos de callos de plantas transgénicas T_0 .

Tal como se describió en la Tabla 8, se cultivaron plantas completas que contenían una cantidad baja de copias (es decir, 1-2 copias) del transgén *PhiYFP* en un invernadero. En general, se utilizaron alrededor de cinco (5) a alrededor de diez (10) eventos por construcción y alrededor de cinco (5) plantas por evento para los análisis de expresión de T_1 . Los datos de ELISA revelaron una expresión uniforme de la proteína *PhiYFP* en las hojas de plantas de maíz T_1 usando construcciones de vectores con el promotor novedoso, pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104), en comparación con la construcción de control, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73).

Se observó una expresión media de la proteína *PhiYFP* de aproximadamente 347 ng/mg ($\pm$ 22,9 ng/mg) de *PhiYFP* para las plantas T₁ con la construcción del promotor novedoso, pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104, (FIG. 9), en comparación con aproximadamente 285,3 ng/mg ($\pm$ 22,7 ng/mg) de proteína *PhiYFP* producida mediante la planta de control con la construcción de control, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73, FIG. 8). Estos resultados confirman que el promotor novedoso de *Z. mays* c.v. B104, tal como se describe en la presente, fue útil en la producción de rasgos transgénicos a niveles elevados de producción de proteína.

Además, la expresión media de PAT para todas las plantas T₁ con pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104) fue de aproximadamente 93,7 ng/mg ($\pm$ 7,4) en comparación con aproximadamente 105,8 ng/mg ($\pm$ 7,4 ng/mg) de proteína PAT producida mediante la planta de control con pDAB105748 del promotor de *Z. mays* c.v. B73. En líneas generales, la expresión de la proteína PAT para todas las plantas de maíz fue considerablemente inferior que la expresión observada para el gen de *PhiYFP* en plantas de maíz.

También se midió la expresión de *PhiYFP* en polen derivado de las panojas de plantas transgénicas T₁ seleccionadas que representan cada una de las construcciones del promotor novedoso descritas en la presente. Tal como se muestra en la FIG. 11, el análisis de imagen del polen transgénico confirma que el promotor novedoso que comprende pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104), como se describe en la presente solicitud, impulsa la expresión elevada de la proteína *PhiYFP* en el polen.