

PROMOTORES DE UBIQUITINA DE MAÍZ NOVEDOSOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta aplicación reivindica el beneficio conforme al artículo
5 119 (e), título 35 del USC [Código de Estados Unidos] de la
solicitud de patente provisional estadounidense n.º
61/922,534, presentada el 31 de diciembre de 2013, cuya
descripción se incorpora a la presente en su totalidad
mediante esta referencia.

10

CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

15

ANTECEDENTES

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

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

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

Asimismo, se prefieren los mecanismos que permiten la

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

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

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 puede comprender una secuencia de polinucleótidos.

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

En una modalidad, una construcción incluye un gen de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos promotora que se obtuvo del gen de Ubi-1 de *Z. luxurians*. En una modalidad, la secuencia de polinucleótidos promotora de Ubi-1 de *Z. luxurians* comprende una región promotora anterior, 5'-UTR o secuencias líderes y un intrón. En una modalidad, una construcción incluye un casete de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos promotora obtenida del gen de Ubi-1 de *Z. luxurians* fusionada a un intrón del gen que codifica la proteína fluorescente amarilla de especies de *Phialidium* (*PhiYFP*, por sus siglas en inglés). En una modalidad, una construcción incluye un casete de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos promotora obtenida del gen de Ubi-1 de *Z. luxurians* fusionada a un intrón del gen que

codifica la proteína fluorescente amarilla de especies de *Phialidium* (PhiYFP) seguida por una región 3' no traducida (3'-UTR) del gen de la Peroxidasa 5 de *Z. mays*. (ZmPer5). La secuencia de polinucleótidos resultante comprende un elemento regulador del gen promotor novedoso.

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

La **FIG. 2** muestra el mapa plásmido para el vector pDAB105711 que comprende la secuencia promotora amplificada de PCR del gen de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2

15 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 promotora anterior subrayada, la secuencia líder/5'-UTR con sombra y la región intrón en minúsculas.

La **Figura 4** muestra la secuencia de polinucleótidos del
20 promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 2) con la región promotora anterior subrayada, la secuencia líder/5'-UTR con sombra y la región intrón en minúsculas.

La Figura 5 muestra la alineación de la secuencia de polinucleótidos de las regiones promotoras anteriores de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 4) comparada con la secuencia promotora anterior de control de *Z. mays* c.v. B73 (SEQ ID NO: 3).

La FIG. 6 muestra la alineación de la secuencia de polinucleótidos de las regiones 5'-UTR/líder de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 6) comparada con la secuencia líder/5'-UTR 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 del intrón de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 8) comparada con la secuencia intrón de control *Z. mays* c.v. B73 (SEQ ID NO: 7).

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

La Figura 9 muestra un mapa de vectores de la construcción de expresión binaria pDAB105744, que comprende el vector de entrada, pDAB105738 (*Z. luxurians* v2), insertados al vector de destino, pDAB10197.

La FIG. 10 muestra la expresión génica *PhiYFP* en el callo

vegetal T₀ para las construcciones de expresión binaria pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73) y pDAB105744 (*Z. luxurians* v2).

La FIG. 11 muestra la expresión génica *PhiYFP* en el polen vegetal T₁ para las construcciones de expresión binaria pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73), pDAB105744 (*Z. luxurians* v2), y un control negativo.

La FIG. 12 un mapa de vectores de las construcciones de expresión binaria, pDAB112854, que comprende el gen indicador *PhiYFP* y la 3'-UTR *ZmPer5* conducida por un promotor de *ZmUbi-1* v2, y el gen *AAD-1* v3 y la 3'-UTR *ZmLip* v1 conducida por una *Z. luxurians* v2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

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

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

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

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

Tal como se usa en la presente, los términos "región 5' no traducida" o "5'-UTR" se refieren al segmento no traducido en el extremo 5' de pre-ARNm o ARNm maduros. Por ejemplo, en los
20 ARNm maduros, una 5'-UTR típicamente posee en su extremo 5' un casquete de 7-metilguanosa y participa en muchos procesos tales como empalme, poliadenilación, exportación del ARNm

hacia el citoplasma, identificación del extremo 5' del ARNm mediante la maquinaria de traducción y protección de los ARNm contra la degradación.

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

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

Tal como se usa en la presente, el término "aislado" se refiere a un componente biológico (inclusive una proteína o

ácido nucleico) que ha sido separado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en la que el componente se origina naturalmente (es decir, otro ADN extracromosomal y cromosomal).

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

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

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

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

también péptidos, proteínas y moléculas de ácido nucleico químicamente sintetizadas.

El término "recombinante" significa una célula u organismo en el que se ha producido la recombinación genética. También
5 incluye una molécula (por ejemplo, un vector, plásmido, ácido nucleico, polipéptido p ARN pequeño) que ha sido alterado artificialmente o sintéticamente (es decir, no naturalmente) por la intervención humana. La alteración se puede realizar dentro de la molécula, o se puede quitar de su entorno o
10 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 pequeñas) y/o el proceso mediante el cual el ARNm transcripto (también
15 llamado "transcripto") se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. La expresión génica puede verse influenciada por señales externas, por ejemplo, exposición de una célula, tejido, u organismo a un agente que aumenta o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen
20 también se puede regular en cualquier parte de la vía de ADN a ARN a proteína. La regulación de la expresión génica ocurre, por ejemplo, a través de controles que actúan en la

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

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

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

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

monocatenarias y bicatenarias del ADN. Una molécula de ácido nucleico puede incluir cualquiera o ambos nucleótidos de origen natural y modificados unidos por enlaces de nucleótidos de origen natural y/o de origen no natural.

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

La transcripción procede desde 5' a 3' a lo largo de la cadena de ADN. Esto significa que el ARN se realiza mediante la adición secuencial de ribonucleótido-5'-trifosfatos al extremo 3' de la cadena creciente con una eliminación necesaria del pirofosfato. Ya sea en una molécula de ácido nucleico lineal o circular, los distintos elementos (por ejemplo, secuencias de nucleótido en particular) se pueden definir como que están "anteriores" con respecto a un elemento adicional si están o estarán unidos al mismo ácido nucleico en la dirección 5' de ese elemento. De manera similar, los distintos elementos pueden estar "posteriores" con respecto a un elemento adicional si están o estarán unidos al mismo ácido nucleico en la dirección 3' de ese elemento.

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

Tal como se usa en la presente, el término "hibridación" se refiere a un proceso donde los oligonucleótidos y sus análogos se hibridan mediante enlaces de hidrógeno, que incluyen los enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen

invertido, entre bases complementarias. Generalmente, las moléculas de ácido nucleico consisten en bases nitrogenadas que son ya sea pirimidinas (citosina (C), uracilo (U), y timina (T)) o purinas (adenina (A) y guanina (G)). Las bases
5 nitrogenadas forman enlaces de hidrógeno entre una pirimidina y una purina, y la unión de una pirimidina a una purina se denomina "apareamiento de bases". Más específicamente, A formará un enlace de hidrógeno a T o U, y G se unirá específicamente a C. "Complementario" se refiere al
10 apareamiento de bases que ocurre entre dos secuencias de ácido nucleico distintas o dos regiones distintas de la misma secuencia de ácido nucleico.

Tal como se usa en la presente, los términos "específicamente hibridable" y "específicamente complementario" se refiere a un
15 grado suficiente de complementariedad de modo que ocurre la unión estable y específica entre un oligonucleótido y un DNA o ARN objetivo. Los oligonucleótidos no tienen que ser necesariamente 100 % complementarios a la secuencia objetivo para hibridarse específicamente. Un oligonucleótido es
20 específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la molécula de ADN o ARN objetivo interfiere con la función normal del ADN o ARN objetivo, y hay suficiente grado de

complementariedad para evitar la unión no específica de un oligonucleótido a secuencias no objetivo en condiciones donde se desea la unión específica, por ejemplo, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos o sistemas *in vivo* . Dicha

5 unión se denomina hibridación específica. Las condiciones de hibridación que dan como resultado grados de rigurosidad en particular variarán en función de la naturaleza del método de hibridación elegido y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico de que se hibridan.

10 Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente concentración de Na^+ y/o Mg^{2+}) de un amortiguador de hibridación contribuirá a la rigurosidad de hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen en la rigurosidad. Los cálculos con respecto a las condiciones

15 de hibridación necesarias para lograr grados de rigurosidad en particular se discuten en Sambrook et ál. (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da. ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.

Tal como se usa en la presente, el término “condiciones de

20 rigurosidad” comprende las condiciones en las que la hibridación solo ocurrirá si hay menos de 50 % de mal apareamiento entre la molécula de hibridación y el ADN

objetivo. "Condiciones de rigurosidad" incluyen niveles adicionales de rigurosidad en particular. Por lo tanto, tal como se usa en la presente, las condiciones de "rigurosidad moderada" son aquellas en las que las moléculas con más de 50 % de mal apareamiento de secuencia no se hibridarán; las condiciones de "rigurosidad alta" son aquellas en las que las secuencias con más de 20 % de mal apareamiento no se hibridarán; y las condiciones de "rigurosidad muy alta" son aquellas en las que las secuencias con más de 10 % de mal apareamiento no se hibridarán.

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

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

amortiguador SSC 2 x a temperatura ambiente durante 5-20 minutos cada uno; y lavar dos veces en amortiguador SSC 1x SSC a 55-70 °C durante 30 minutos cada uno.

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

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

Tal como se usa en la presente, el término "oligonucleótido" se refiere a un polímero de ácido nucleico corto. Los oligonucleótidos se pueden formar mediante la escisión de segmentos de ácido nucleico más largos o mediante la polimerización de los precursores de nucleótidos individuales. Los sintetizadores automáticos permiten la síntesis de

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

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

cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR se puede usar para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN de ADN genómico total, y ADNc transcrito de ARN celular total, 5 secuencias de bacteriófagos o plásmidos, etc. Ver en general, Mullis et ál., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263 (1987); Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989).

Tal como se usa en la presente, el término "cebador" se 10 refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis junto con una cadena complementaria, cuando las condiciones son adecuadas para la síntesis de un producto de extensión de cebador. Las condiciones de síntesis incluyen la presencia de cuatro 15 deoxirribonucleótidos trifosfato diferentes (es decir, A, T, G y C) y al menos una enzima o un agente de inducción de la polimerización tal como una transcriptasa inversa o ADN polimerasa. Estos reactivos típicamente están presentes en un amortiguador adecuado, que puede incluir constituyentes 20 que son cofactores o que afectan condiciones tales como el pH y similares a varias temperaturas adecuadas. Un cebador es preferentemente una secuencia de cadena simple, de modo que

se optimiza la eficacia de amplificación, pero se pueden utilizar secuencias de cadena doble.

Tal como se usa en la presente, el término "sonda" se refiere a una secuencia de polinucleótidos u oligonucleótidos que se hibridan a una secuencia objetivo. En el procedimiento de ensayo TaqMan® o de estilo TaqMan®, la sonda hibrida a una parte del objetivo situado entre el sitio de hibridación de los dos cebadores. Una sonda incluye alrededor de ocho nucleótidos, alrededor de diez nucleótidos, alrededor de quince nucleótidos, alrededor de veinte nucleótidos, alrededor de treinta nucleótidos, alrededor de cuarenta nucleótidos o alrededor de cincuenta nucleótidos. En algunas modalidades, una sonda incluye de alrededor de ocho nucleótidos a alrededor de quince nucleótidos.

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

Una sonda puede también incluir una etiqueta detectable, tal como, etiqueta radioactiva, etiqueta biotinilada (por ejemplo, Texas-Red[®], isotiocianato de fluoresceína, etc.). La etiqueta detectable puede estar unida de manera covalente
5 directamente al oligonucleótido de sonda, de manera que la etiqueta esté ubicada en el extremo 5' o en el extremo 3' de la sonda. Una sonda que comprende un fluoróforo también puede incluir adicionalmente un inactivador (por ejemplo, Black Hole Quencher[™], Iowa Black[™], etc.).

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

Tal como se usa en la presente, el término "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje de homología de secuencia" se refiere a un valor determinado al comparar dos secuencias alineadas de forma óptima (por ejemplo, secuencias
20 de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos) en una ventana de comparación, donde la parte de una secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones, sustituciones,

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

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

5 Nacional para la Información Biotecnológica (Bethesda, MD), y en internet, para usar en relación con varios programas de análisis de secuencias. En la sección de "ayuda" de BLAST™ en internet se proporciona una descripción sobre cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa. Para

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

15 aumento cuando se analizan con este método.

Tal como se usa en la presente, el término "unido de manera operativa" se refiere a un ácido nucleico colocado en una relación funcional con otro ácido nucleico. Generalmente, "unido de manera operativa" puede significar que los ácidos

20 nucleicos enlazados están contiguos. La unión se puede lograr mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los enlazadores o adaptadores de

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

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

Tal como se usa en la presente, el término "promotor
20 anterior" se refiere a una secuencia de polinucleótidos contigua que es suficiente para dirigir el inicio de la transcripción. Tal como se usa en la presente, un promotor

anterior comprende el sitio de inicio de la transcripción con varios motivos de secuencias, que incluye una caja TATA, una secuencia iniciadora (Intr), elementos de reconocimiento de TFIIB (BRE) y otros motivos de promotores (Jennifer, E.F. et al, (2002) *Genes & Dev.*, 16: 2583-2592). El promotor anterior proporciona el sitio de acción a la ARN polimerasa II, una enzima con múltiples subunidades con los factores de transcripción general o basal tipo TFIIA, B, D, E, F y H. Estos factores se ensamblan en un complejo de preinicio de la transcripción (PIC, por sus siglas en inglés) que cataliza la síntesis de ARN de una plantilla de ADN.

La activación del promotor anterior se realiza mediante la adición de elementos de secuencias de ADN reguladoras a las cuales se unen varias proteínas y subsecuentemente interactúan con el complejo de inicio de la transcripción para activar la expresión génica. Estas secuencias de elementos reguladores interactúan con factores de unión a ADN específicos. Estos motivos de secuencias a veces se pueden llamar elementos *cis*. Tales elementos *cis*, a los que se unen los factores de transcripción específicos del desarrollo o específicos del tejido, individualmente o en combinación, pueden determinar el patrón de expresión espaciotemporal de

in promotor en el nivel transcripcional. Estos elementos *cis* varían ampliamente en el tipo de control que ejercen en los genes unidos de manera operativa. Algunos elementos actúan para aumentar la transcripción de genes unidos de manera operativa en respuesta a respuestas ambientales (por ejemplo, 5 temperatura, humedad y lesión). Otros elementos *cis* pueden responder a las señales del desarrollo (por ejemplo, germinación, maduración de la semilla y florecimiento) o a la información espacial (por ejemplo, la especificidad del 10 tejido). Ver, por ejemplo, Langridge et ál. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3219-23. Estos elementos *cis* están ubicados a una distancia variante del punto de inicio de la transcripción. Algunos elementos *cis* (llamados elementos próximos) están adyacentes a una región promotora nuclear 15 mínima, mientras que otros elementos se pueden ubicar a varios kilobases 5' anteriores o 3' posteriores del promotor (potenciadores).

Tal como se usa en la presente, el término "transformación" abarca todas las técnicas por las cuales se puede introducir 20 una molécula de ácido nucleico en una célula. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo: transfección con vectores víricos; transformación con vectores de plásmidos;

electroporación; lipofección; microinyección (Mueller *et ál.* (1978) Cell 15:579-85); transferencia mediada por *Agrobacterium*; ABSORCIÓN DIRECTA DEL ADN; TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR WHISKERS™; Y BOMBARDEO DE MICROPROYECTILES. Estas

5 técnicas se pueden usar para la transformación estable y para la transformación transitoria de una célula vegetal. "Transformación estable" se refiere a la introducción de un fragmento de ácido nucleico en un genoma de un organismo hospedador lo que resulta en una herencia estable

10 genéticamente. Una vez que está transformado de manera estable, el fragmento de ácido nucleico se integra establemente en el genoma del organismo hospedador y cualquier generación posterior. Los organismos hospedadores que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se

15 llaman organismos "transgénicos". "Transformación transitoria" se refiere a la introducción de un fragmento de ácido nucleico en el núcleo u organelo que contiene ADN de un organismo hospedador, lo que resulta en la expresión génica sin herencia estable genéticamente.

20 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 exógena. En un ejemplo, un transgén es una secuencia de genes (por ejemplo, un gen con resistencia a herbicidas), un gen que codifica un compuesto útil farmacéutica e industrialmente, o un gen que codifica un rasgo agrícola deseable. En aun otro ejemplo, un transgén es una secuencia de ácido nucleico antisentido, donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico antisentido inhibe expresión de una secuencia de ácido nucleico objetivo.

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

Tal como se usa en la presente, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico de la manera que se introduce en una célula, produciendo de esa manera una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido

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

Tal como se usa en la presente, los términos "casete", "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 un polipéptido de interés y el casete y los sitios de restricción se designan

para asegurar la inserción del casete en el marco de lectura adecuado para la transcripción y traducción. En una modalidad, un casete de expresión puede incluir un polinucleótido que codifica un ARN pequeño o un polipéptido de interés y tiene elementos además del polinucleótido que facilitan la transformación de una célula hospedadora particular. En una modalidad, un casete de expresión génica también puede incluir elementos que permiten la expresión mejorada de un ARN pequeño o un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés en una célula hospedadora. Estos elementos pueden incluir, de modo no taxativo: un promotor, un promotor mínimo, un potenciador, un elemento de respuesta, un intrón, un 5'-UTR, un 3'-UTR, una secuencia de terminación, una secuencia de poliadenilación y similares.

Tal como se usa en la presente, el término "secuencia codificante heteróloga" se usa para indicar cualquier polinucleótido que codifique o que finalmente codifique un péptido o proteína o su secuencia de aminoácidos equivalente, por ejemplo, una enzima que no está presente en el organismo hospedador y que se puede expresar en la célula hospedadora a condiciones adecuadas. De tal manera, las "secuencias codificantes heterólogas" pueden incluir una o más copias de

secuencias codificantes que no están normalmente presentes en la célula hospedadora, de manera que la célula expresa copias adicionales de una secuencia codificante que no está presente normalmente en las células. La secuencia codificante

5 heteróloga puede ser ARN o cualquier tipo de esta (por ejemplo, ARNm), ADN o cualquier tipo de este (por ejemplo, ADNc), o un híbrido de ARN/ADN. Los ejemplos de secuencias codificantes incluyen, de modo no taxativo, unidades de transcripción de longitud completa que comprenden dichas

10 características como la secuencia codificante, intrones, regiones promotoras, 5'-UTR, 3'-UTR y regiones potenciadoras. Las "secuencias codificantes heterólogas" también incluyen la parte codificante del péptido o enzima (es decir, la secuencia de ARNm o ADNc), la parte codificante de la unidad

15 de transcripción de longitud completa (es decir, el gen que comprende intrones y exones), secuencias con "codones optimizados", secuencias truncadas u otras formas de secuencias alteradas que codifican la enzima o codifican su secuencia de aminoácido equivalente, siempre que la secuencia

20 de aminoácidos equivalente produzca una proteína funcional. Dicha secuencia de aminoácidos equivalente puede tener una eliminación de uno o más aminoácidos, la eliminación es de

extremo N, extremo C o interna. Las formas truncadas se visualizan siempre que tengan la capacidad catalítica indicada en ella.

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

Tal como se usa en la presente, el término "planta" incluye plantas o partes de plantas, incluyendo, de modo no taxativo células vegetales y tejidos vegetales, tales como hojas, callos, vástagos, raíces, flores, polen y semillas. Una clase de planta que se puede usar en la presente invención es generalmente tan amplia como la clase de plantas inferiores y superiores susceptibles a mutagénesis incluyendo angiospermas, gimnospermas, helechos y algas multicelulares. Por lo tanto, "planta" incluye plantas dicotiledóneas y

monocotiledóneas. Los ejemplos de plantas dicotiledóneas incluyen, tabaco, *Arabidopsis*, soja, tomate, papaya, canola, girasol, algodón, alfalfa, papa, vid, guandul, guisante, *Brassica*, garbanzo, remolacha azucarera, colza, sandía, melón, pimienta, maní, calabaza, rábano, espinaca, calabacín, brócoli, repollo, zanahoria, coliflor, apio, repollo chino, pepino, palta y lechuga. Los ejemplos de plantas monocotiledóneas incluyen maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, cebada, centeno, sorgo, orquídeas, bambú, banana, totora, lirios, avena, cebolla, mijo y triticale.

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

Tal como se usa en la presente, el término "gen marcador seleccionable" se refiere a un gen que se usa opcionalmente en la transformación vegetal para, por ejemplo, proteger células vegetales de un agente selectivo o proporcionar

resistencia/tolerancia a un agente selectivo. Además, "gen
marcador seleccionable" pretende comprender genes
indicadores. Solo aquellas células o plantas que reciben un
marcador seleccionable funcional son capaces de dividirse o
5 crecer en condiciones con un agente selectivo. Los ejemplos
de agentes selectivos pueden incluir, por ejemplo,
antibióticos, incluyendo espectinomicina, neomicina,
kanamicina, paromomicina, gentamicina e higromicina. Estos
marcadores seleccionables incluyen neomicina fosfotransferasa
10 (npt II), que expresa una enzima que confiere resistencia al
antibiótico kanamicina y genes para los antibiótico
relacionados neomicina, paromomicina, gentamicina y G418, o
el gen para higromicina fosfotransferasa (hpt), que expresa
una enzima que confiere resistencia a higromicina. Otros
15 genes marcadores seleccionables pueden incluir genes que
codifican la resistencia a herbicidas incluyendo bar o pat
(resistencia contra glufosinato de amonio o fosfinotricina),
acetolactato sintasa (ALS, resistencia contra inhibidores
tales como sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI),
20 triazolopirimidinas (TP), oxibenzoatos de pirimidinilo (POB,
por sus siglas en inglés), y sulfonilamino carbonil
triazolinonas que evitan el primer paso en la síntesis de

aminoácidos de cadena ramificada), glifosato, 2,4-D, y resistencia o sensibilidad metálica. Los ejemplos de “genes indicadores” que pueden usarse como un gen marcador seleccionable incluyen la observación visual de proteínas de gen indicador expresadas tales como proteínas que codifican la β -glucuronidasa (GUS), luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), proteína amarilla fluorescente (YFP, por sus siglas en inglés), DsRed, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), fosfatasa alcalina y similares. La frase “positivo para marcador” se refiere a plantas que se han transformado para que incluyan un gen marcador seleccionable.

Tal como se usa en la presente, el término “marcador detectable” se refiere a una etiqueta capaz de detectarse, tales como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminescente, un compuesto quimioluminescente, quelante metálico o enzima. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, de modo no taxativo, los siguientes: etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina),

quimioluminescente, grupos biotinilo, epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítomos). En una modalidad, un marcador detectable puede estar unido mediante grupos espaciadores de varias longitudes para reducir impedimentos estéricos potenciales.

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

A menos que se explique específicamente lo contrario, todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente tienen el mismo significado comprendido comúnmente por los expertos en la técnica a los que concierne esta divulgación. Las definiciones de los términos comunes en la biología molecular se pueden encontrar, por ejemplo en: Lewin, Genes V, Oxford University Press, 1994; Kendrew et ál. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994; and Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995.

Los promotores como elementos reguladores de la expresión génica

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

El desarrollo de los productos transgénicos se está volviendo
muy complejo, lo que requiere que se expresen transgenes y que
se apilen múltiples transgenes en un solo locus.
Tradicionalmente, cada transgén necesita un promotor único
20 para la expresión donde se necesitan múltiples promotores para
expresar transgenes diferentes dentro de una pila de genes.
Con un tamaño en aumento de rasgos génicos, este método

frecuentemente conlleva al uso repetido del mismo promotor para obtener niveles similares de patrones de expresión de diferentes transgenes para la expresión de un único rasgo poligénico.

- 5 Se sabe que las construcciones génicas múltiples conducidas por el mismo promotor causan el silenciamiento de genes lo que resulta en productos transgénicos menos eficaces en el campo. El exceso de sitios de unión a factores de transcripción (TF, por sus siglas en inglés) debido a la repetición de promotores
- 10 puede causar la disminución de TF endógeno, lo que lleva a la inactivación transcripcional. El silenciamiento de los transgenes probablemente afectará de forma no deseada el rendimiento de una planta transgénica producida para expresar transgenes. Las secuencias repetitivas dentro de un transgén
- 15 pueden llevar a la recombinación homóloga dentro del locus del gen lo que resulta en reestructuraciones de polinucleótidos. Además de los promotores constitutivos, los promotores específicos de órganos o específicos de tejidos conducen la expresión génica en determinados tejidos tales como en el
- 20 grano, raíz, hoja, callo, polen o tapetum de la planta. Los promotores específicos de la etapa de desarrollo y de tejidos conducen la expresión de genes, que se expresan en tejidos

particulares o en períodos de tiempo particulares durante el desarrollo de la planta. Los promotores específicos de los tejidos son necesarios para determinadas aplicaciones en la industria de plantas transgénicas y son deseables ya que

5 permiten la expresión específica de genes heterólogos en un tejido y/o en etapas de desarrollo seleccionadas, que indican la expresión del gen heterólogo de manera diferencial en varios órganos, tejidos, y/o en diferentes momentos, pero no otros.

10 Por ejemplo, la resistencia aumentada de una planta a la infección por los patógenos transmitidos por la tierra se puede lograr mediante la transformación del genoma vegetal con una proteína de resistencia a los patógenos que se expresa de gran manera dentro de la planta. De manera

15 alternativa, puede ser conveniente expresar un transgén en tejidos vegetales que están en una fase determinada de desarrollo o crecimiento particular, tal como, por ejemplo, la elongación o división celular. Otra aplicación es la conveniencia de usar promotores específicos de tejidos, de

20 manera que los promotores limiten la expresión de los transgenes que codifican un rasgo agronómico en las partes de las plantas en desarrollo (es decir, raíces, hojas, callos o

polen).

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

20

Promotores de Ubiquitina-1 de *Zea mays* y *Zea luxurians*

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

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

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

la identificación y purificación de promotores novedosos de diferentes especies de *Zea*.

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

espacio-temporal de un promotor.

Haciendo referencia a la Figura 1, el promotor del gen Ubi-1 de *Z. mays* deriva de la línea celular endogámica B73 de *Z.mays*. El promotor Ubi-1 de *Z. mays* está conformado por
5 aproximadamente 895 pb de secuencia de ADN ubicada 5' anterior al TSS (es decir, el elemento anterior). Además, el promotor Ubi-1 de *Z. mays* está conformado por aproximadamente 1093 pb de secuencia de ADN ubicada 3' posterior al TSS (ver patente estadounidense 5,510,474). Por lo tanto, el promotor
10 Ubi-1 de *Z. mays* está conformado por aproximadamente 2 pares de kilobases (kb) de secuencia de ADN en total.

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

Trabajos anteriores han descrito un aumento de la expresión génica de genes y/o transgenes regulados por el promotor Ubi-

1 de *Z. mays*. Por ejemplo, la fusión de transcripción del gen cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) al promotor Ubi-1 de *Z. mays* proporcionó un aumento de 10 veces del nivel de actividad de CAT en protoplastos de maíz que la expresión
 5 conducida por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CHRISTENSEN and QUAIL 1996; CHRISTENSEN *et al.* 1992).

Además del promotor Ubi-1 de *Z. mays* de control, esta solicitud describe un promotor novedoso Ubi-1 de *Z. mays*. Al contrario del promotor Ubi-1 de *Z. mays* de control derivado
 10 del genotipo de *Z. mays* c.v. B73, el promotor de Ubi-1 novedoso se derivó de una especie diferente de *Zea*, *Zea luxurians*. El promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* usado en la presente tenía el genotipo de versión 2 (v2). Se proporcionan construcciones y métodos que utilizan un
 15 promotor de Ubi-1 de *Z. mays* o or *Z. luxurians* que comprende una secuencia de polinucleótidos. En una modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos del gen Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como figura a continuación:

20 GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGTTAT
 AAAAAATTACCACATATTTTTTTTGTACACTTGTTTGAAGTGAGTTTATCTATCTTTAT
 ACATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTG

TTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGA
CAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTTGCAAAT
AGCTTCACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTA
ATGGTTTTTTATAGACTAATTTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATT
5 AAGAAAACATAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATATAAAATAGAATAA
AATAAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAAACTAAGGAAACAT
TTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTAAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACA
CCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTG
TCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGG
10 CATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCT
CCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCTTTTCCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTC
CTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCCTCCACACCCTCTTTCCCCAACCTCGTGTTGTT
CGGAGCGCACACACACACAACCAGATCTCCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCA
AGGTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGTTCCG
15 GTCCATGCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGT
TTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGACACGTT
CTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCG
CAGACGGGATCGATTTTCATGATTTTTTTTTGTTTCGTTGCATAGGGTTTGTTTGCCTTTTT
CCTTTATTTCAATATATGCCGTGCACTTGTTTGTGCGGGTCATCTTTTCATGCTTTTTTTTTG
20 TCTTGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTT
TCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAATTTTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATATTCATA
GTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCG

GGTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTGTTTCGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTG
 GTTGGGCGGTCGTTTCATTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGT
 ATTTATTAATTTTGGAACTGTATGTGTGTGTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGAT
 GGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTACTGATGCATATA
 5 CATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAAT
 AAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTCGATCTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCA
 GCTATATGTGGATTTTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTC
 TTTTGTGATGCTCACCTGTTGTTTGGTGTACTTCTGCA (SEQ ID NO: 1)

En otra modalidad, un promotor puede comprender una secuencia
 10 de polinucleótidos del gen Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 como
 figura a continuación:

GACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAGGTATCAAAAATTA
 TCACATATTTTTTTTTGTCACACTTGTTTAAAGTGCAGTTTATCTATCTCTATATACATATT
 TAAACTCCACTTTATAAATAATATAGTCTATAATACTAAAATAATATCAGTGTTTTAGATG
 15 ATCATATAAGTGAAGTCTAGACATGATCTAAAGGACAACCGAGTATTTTGACAACAGGAC
 TCTACAGTTTTACCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCTCTGTTTTTTTTTCAAATAGCTTGA
 CCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGATTTAGGGTTGATGGTTT
 CTATAGACTAATTTTTTAGTACATCTATTTTATTATTTTAAATTTTAAATTAAGAAAAC
 GAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAATGAAATAAAATAAATTT
 20 ACTACAAATTAACAAATACCCTTTAAGGAATTAAAAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGT
 TTCGAGTAGATTATGACAGCCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGC
 GAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGACGCTGCCT

CTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAA
ATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCCTCCTCCTCCTATCACGGCACCGGCAGCT
ACGGGGGATTCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTCCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAG
ACACCCCCTCCACACCCTCTTTCCCCAACCTGTGTTGTTAGGAGCGCACACACACACACAA
5 CCAGATCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGGTACGCCGCTCATCCTCC
TCCTCCCTCCCCCTCTCTACCTTATCTAGATCGGCGATCCGGTCCATGGTTAGGGCCCGGT
AGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTTCGTACACGGATGCG
ACCTGTACATCAGACACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGGCGAATCCAG
GGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGTTCGATTTTCATGATTTTTTTTTGTTTCGTTTCAC
10 ATAGGGTTTGGTTTGCCCTTTTCCTTTATTTCTTATATGCTGTGCACTTTTTGTCGGGTC
ATCTTGTCATGCTTTTTTTTAAATCTTGGTTGTGATGATGTGCTCTGGTTGGGCGGTCGTTT
TAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAATTCTGGATCTGTAT
GTGTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATTATGGATGGAAATATCGATCTAG
GATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTTTTCGC
15 TTGGTTGTGATGATGCGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTC
AAACTACCTGGTGGATTTATTAATTCTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATCTTGATAGT
TACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTCGATGTGGG
TTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAG
TACCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTGACCTTGATATACTTGGA
20 TGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTAGCCTTGCCTTCATACGCTATTTAT
TTGCTTGGGGCTGTTTCTTTTTGTTGACGCTCACCCGTGTTGTTTGGTGTACTTCTGCAG
(SEQ ID NO: 2)

Los promotores descritos en la presente se caracterizaron por clonación y posterior análisis de homología de la secuencia de ADN para identificar regiones específicas del promotor (es decir, las regiones anteriores al promotor, 5'-UTR e intrón).

5 Se proporcionan construcciones y métodos que utilizan un promotor constitutivo Ubi-1 de *Z. mays* o *Z. luxurians* que comprende secuencias de polinucleótidos de una región promotora anterior, 5-UTR o región líder y un intrón para la expresión de transgenes en plantas. En una modalidad, un
10 promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos promotora anterior del gen Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como figura a continuación:

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGTTAT
AAAAAATTACCACATATTTTTTTTGTACACTTGTTTGAAGTGCAGTTTATCTATCTTTAT
15 ACATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTG
TTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGA
CAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTTGCAAAT
AGCTTCACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTA
ATGGTTTTTATAGACTAATTTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATT
20 AAGAAAACATAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATATAAAATAGAATAA
AATAAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTAATAAACTAAGGAAACAT
TTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTAAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACA

CCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTG
 TCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGG
 CATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCT
 CCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCTTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTC
 5 CTCGCCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTCCACACCCTCTT (SEQ ID NO: 3)

En otra modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos promotora anterior del gen Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 como figura a continuación:

GACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAGGTATCAAAAATTA
 10 TCACATATTTTTTTTGTACACTTGTTTAAAGTGCAGTTTATCTATCTCTATATACATATT
 TAAACTCCACTTTATAAATAATATAGTCTATAATACTAAAATAATATCAGTGTTTTAGATG
 ATCATATAAGTGAAGTGTAGACATGATCTAAAGGACAACCGAGTATTTTGACAACAGGAC
 TCTACAGTTTTTACCTTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCTCTGTTTTTTTTTCAAATAGCTTGA
 CCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGATTTAGGGTTGATGGTTT
 15 CTATAGACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTATTTTTTAATTTTTAAATTAAGAAAAT
 GAAACTCTATTTTAGTTTTTTTTATTTAATAATTTAGATATAAAATGAAATAAAATAAATTT
 ACTACAAATTAAACAAATACCCTTTAAGGAATTAAAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGT
 TTCGAGTAGATTATGACAGCCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGC
 GAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGACGCTGCCT
 20 CTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAA
 ATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCCTCCTCCTCTATCACGGCACCGGCAGCT
 ACGGGGGATTCTTTTCCACCGCTCCTTCGCTTCCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAG

ACACCCCCTCCACACCCTCTT (SEQ ID NO: 4)

Elementos reguladores génicos adicionales

La expresión del transgén también se puede regular
5 mediante una región 5'-UTR y/o intrón ubicada posterior a la
secuencia promotora anterior. Un promotor que comprende una
región promotora anterior unida de manera operativa a una 5'-
UTR y/o intrón puede regular la expresión del transgén. Si
bien es necesario un promotor anterior para conducir la
10 transcripción, la presencia de una 5'-UTR y/o intrón puede
aumentar los niveles de expresión que resultan en la
producción de más transcritos de ARNm para la traducción y
síntesis de proteínas. La adición de una 5'-UTR y/o intrón a
una secuencia de polinucleótidos promotora anterior puede
15 colaborar con la expresión estable de un transgén.

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

TCCCCAACCTCGTGTTGTTTCGGAGCGCACACACACACAACCAGATCTCCCCCAAATCCACC
CGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO: 5)

En otra modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos 5'-UTR o líder del gen Ubi-1 de *Z.*

5 *luxurians* v2 como figura a continuación:

TCCCCAACCTCGTGTTGTTAGGAGCGCACACACACACACAACCAGATCTCCCCCAAATCCAC
CCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO: 6)

Adicionalmente, un promotor constitutivo que comprende secuencia de polinucleótidos promotora anterior

10 seguida por una región líder o 5-UTR puede también ser seguida por un intrón para colaborar en

la expresión de los transgenes en plantas. En una modalidad, un promotor puede comprender una

secuencia de polinucleótidos de intrones del gen Ubi-1 de *Z.*

15 *mays* c.v. B73 como figura a continuación:

GTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGTTCCGGT
CCATGCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGTTT
GTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGACACGTTCT
GATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCA
20 GACGGGATCGATTTTCATGATTTTTTTTGTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTTGCCCTTTTCC
TTTATTTCAATATATGCCGTGCACTTGTTTGTGCGGTCATCTTTTCATGCTTTTTTTTGTG
TTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTTC

AAACTACCTGGTGGATTTATTAATTTTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATATTCATAGT
TACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGG
TTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTGTTGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGT
TGGGCGGTCGTTCAATTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGTAT
5 TTATTAATTTTGGAACTGTATGTGTGTGTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGG
ATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTACTGATGCATATACA
TGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAA
ACAAGTATGTTTTATAATTATTTTCGATCTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGC
TATATGTGGATTTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTT
10 TTGTCGATGCTCACCTGTTGTTTGGTGTACTTCTGCA (SEQ ID NO: 7)

En otra modalidad, un promotor puede comprender una secuencia de polinucleótidos de intrones del gen Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 como figura a continuación:

GTACGCCGCTCATCCTCCTCCTCCCCCTCTCTACCTTATCTAGATCGGCGATCCGGT
15 CCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAG
CGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACATCAGACACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTT
TCTCTTTGGCGAATCCAGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGTTGATTTTCATGATT
TTTTTTGTTTCGTTTCACATAGGGTTTGGTTTGCCCTTTTCCTTTATTTCCCTTATATGCTG
TGCACTTTTTGTGCGGGTCATCTTGTCATGCTTTTTTTAAATCTTGGTTGTGATGATGTGCT
20 CTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTA
TTAATTCTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATTATGG
ATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACA

GAGATGCTTTTTTTTCGCTTGGTTGTGATGATGCGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATC
 GGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAATTCTGGATCTGTATGTGTGT
 GCCATACATCTTGATAGTTACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGG
 TATACATGTCGATGTGGGTTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTC
 5 ATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTTATAATTATTTT
 GACCTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTTAGCCTTG
 CCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGGGCTGTTTCTTTTTGTTGACGCTCACCTGTTGTT
 TGGTGTTACTTCTGCAG (SEQ ID NO: 8)

10 **Casetes de expresión del gen indicador y transgén**

La expresión transgénica puede también ser regulada por un casete de expresión génica. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor Ubi-1. En
 15 una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor Ubi-1 de una planta. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v2.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un
 20 promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v2, donde el promotor es idéntico en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ

ID NO: 2. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor constitutivo, tal como el promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v2, que se encuentra unido operativamente a un transgén o gen indicador. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor constitutivo que se encuentra unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor constitutivo puede conducir la expresión de uno o más transgenes o genes indicadores. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor constitutivo puede conducir la expresión de dos o más transgenes o genes indicadores.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v2, donde la secuencia promotora anterior es idéntica en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 4. En una modalidad, un casete

de expresión génica comprende un promotor constitutivo, tal como el promotor anterior Ubi-1 de *Z. luxurians* v2, que se encuentra unido operativamente a un transgén o gen indicador. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un

5 promotor anterior constitutivo que se encuentra unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un

10 transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor anterior constitutivo puede conducir la expresión de uno o más transgenes o genes indicadores. En una

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

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

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

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v2, donde la secuencia 5'-UTR o líder es idéntica en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 6. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR o líder de un gen de maíz que codifica una proteína de Ubiquitina-1 que está unida de manera operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 o un promotor que tiene origen en una planta (por ejemplo, el promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays* o *Zea luxurians*), un virus (por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende

una secuencia líder o 5'-UTR de *Z. luxurians* v2 de un gen de maíz que codifica una proteína de Ubiquitina que se encuentra unida de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v2, donde la secuencia de intrones es idéntica en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 8. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón de un gen de maíz que codifica una proteína de Ubiquitina-1 que está unida de manera operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 o un promotor que tiene origen en una planta (por ejemplo, el promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays* o *Zea luxurians*), un virus (por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad

ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un intrón de un gen de maíz que codifica una proteína de Ubiquitina que se encuentra unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

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

En una modalidad, una célula o una planta comprende un casete de expresión génica tal como se describe en la presente. En una modalidad, una célula o una planta comprende un vector que comprende un casete de expresión génica tal como se describe en la presente. En una modalidad, un vector puede ser un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial bacteriano

(BAC), un bacteriófago o un virus. Por lo tanto, una célula o una planta que comprende un casete de expresión génica es una célula transgénica o una planta transgénica, respectivamente. En una modalidad, una planta transgénica puede ser una planta monocotiledónea o dicotiledónea. Una modalidad de una planta transgénica monocotiledónea puede ser, de modo no taxativo, maíz, trigo, sorgo, avena, centeno, bananas, caña de azúcar y mijo. Una modalidad de una planta transgénica dicotiledónea puede ser, de modo no taxativo, soja, algodón, girasol o canola. Una modalidad también incluye una semilla transgénica de una planta transgénica, según se describe en la presente.

Marcadores seleccionables

Varios marcadores seleccionables también descritos como genes indicadores se pueden incorporar en un vector de expresión elegido para permitir la identificación y la selección de plantas transformadas ("transformantes"). Hay disponibles muchos métodos para confirmar la expresión de marcadores seleccionables en plantas transformadas, inclusive, por ejemplo, la secuenciación de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transferencia Southern, transferencia de ARN, métodos inmunológicos para la detección de una proteína

expresada del vector, tal como la proteína precipitada que media la resistencia de fosfinotricina, u observación visual de otras proteínas tales como genes indicadores que codifican la β -glucuronidasa (GUS), luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), proteína amarilla fluorescente (YPF),
5 DsRed, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), fosfatasa alcalina y similares (ver Sambrook, et ál., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001, cuyo contenido se incorpora
10 a la presente en su totalidad mediante esta referencia).

Los genes marcadores seleccionables se utilizan para la selección de tejidos o células transformadas. Los genes marcadores seleccionables incluyen genes que codifican la resistencia a antibióticos, tales como los que codifican
15 neomicina fosfotransferasa II (NEO) y higromicina fosfotransferasa (HPT) así como también genes que confieren resistencia a compuestos herbicidas. Los genes de resistencia a herbicidas generalmente codifican para una proteína objeto modificada que es insensible al herbicida o
20 para una enzima que degrada o desintoxica al herbicida en la planta antes de que pueda actuar. Por ejemplo, la resistencia a glifosato se ha obtenido usando genes que

codifican para enzimas objeto mutantes, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Los genes y mutantes para EPSPS son bien conocidos y se describen en detalle a continuación. La resistencia al amonio de 5 glufosinato, bromoxinilo y 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) ha sido obtenida usando genes bacterianos que codifican el gen *pat* o *DSM-2*, una *nitrilasa*, un gen *aad-1* o un *aad-12*, que desintoxica los herbicidas respectivos.

En una modalidad, los herbicidas pueden inhibir el punto de 10 crecimiento o meristemo, que incluyen imidazolinona o sulfonilurea y genes para la resistencia/tolerancia de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) y acetolactato sintasa (ALS). Los genes de resistencia a glifosato incluyen 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSP) mutantes y 15 genes *dgt-28* mediante la introducción de ácidos nucleicos recombinantes y/o varias formas de mutagénesis *in vivo* de los genes EPSP nativos, genes *aroA* y genes glifosato acetil transferasa (GAT), respectivamente. Los genes de resistencia para otros compuestos fosfono incluyen genes BAR de especies 20 de *Streptomyces*, inclusive *Streptomyces hygroscopicus* y *Streptomyces viridichromogenes* y ácidos propiónicos de fenoxi o piridinoxi y ciclohexonas (genes que codifican inhibidores

de ACCasa). Los genes de ejemplo que confieren resistencia a ácido ariloxifenoxipropanóico y ciclohexanedionas (inclusive Haloxifop, Diclofop, Fenoxiprop, Fluazifop, Quizalofop) incluyen genes de acetil coenzima A carboxilasa (ACCasa)--
 5 Acc1-S1, Acc1-S2 y Acc1-S3. En una modalidad, los herbicidas pueden inhibir la fotosíntesis, inclusive la triazina (genes psbA y 1s+) o benzonitrilo (gen nitrilasa).

En una modalidad, los genes marcadores seleccionables incluyen, de modo no taxativo, genes que codifican: neomicina
 10 fosfotransferasa II; cianamida hidratasa; aspartato cinasa; dihidrodipicolinato sintasa; triptófano descarboxilasa; dihidrodipicolinato sintasa y aspartato cinasa desensibilizada; gen bar; triptófano decarboxilasa; neomicina fosfotransferasa (NEO); higromicina fosfotransferasa (HPT o
 15 HYG); dihidrofolato reductasa (DHFR); fosfinotricina acetiltransferasa; dehalogenasa de ácido 2,2-dicloropropiónico; acetohidroxiácido sintasa; 5-enolpiruvilshikimato-fosfate sintasa (aroA); haloarilnitrilasa; acetilcoenzima A carboxilasa; dihidropteroato sintasa (sul I); y
 20 polipéptido de fotosistema II de 32 kD (psbA).

Una modalidad también incluye genes que codifican resistencia a: cloranfenicol; metotrexato; higromicina; espectinomicina;

bromoxinilo; glifosato; y fosfinotricina.

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

Los genes marcadores seleccionables se sintetizan para la expresión óptima en una planta. Por ejemplo, en una modalidad, una secuencia que codifica un gen ha sido modificada por una optimización de codón para mejorar la
10 expresión en las plantas. Un gen marcador seleccionable se puede optimizar para la expresión en una especie de planta particular o alternativamente se puede modificar para la expresión óptima en las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los codones preferidos de las plantas se
15 pueden determinar a partir de de codones más frecuentes en las proteínas expresadas en la cantidad más grande en las especies de plantas de interés particulares. En una modalidad, un gen marcador seleccionable está diseñado para ser expresado en plantas a un nivel más alto, lo que resulta
20 en una eficiencia de transformación mayor. Los métodos para la optimización vegetal de genes son bien conocidos. Las guías para la optimización y fabricación de secuencias

sintéticas de polinucleótidos se pueden encontrar en, por ejemplo, W02013/016546, W02011/146524, W01997/013402, patente estadounidense n.º 6,166,302 y patente estadounidense n.º 5,380,831, incorporados a la presente mediante referencia.

5

Transgenes

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

En una modalidad, el elemento regulador del promotor constitutivo de la presente descripción se combina o se une
15 de manera operativa a uno o más genes que codifican secuencias de polinucleótidos que proporcionan resistencia o tolerancia al glifosato, 2,4-D glufosinato u otro herbicida, proporcionan resistencia a enfermedades o insectos seleccionados y/o mejoras nutricionales, características
20 agronómicas mejoradas, proteínas u otros productos útiles para usos nutricionales, alimenticios, industriales, farmacéuticos u otros. Los transgenes pueden "apilarse" con

dos o más secuencias de ácido nucleico de interés dentro del genoma de una planta. El apilamiento se puede lograr, por ejemplo, a través del fitomejoramiento convencional de vegetales utilizando dos o más eventos de los siguientes:

5 transformación de un vegetal con una construcción que contiene las secuencias de interés, retransformación de un vegetal transgénico, o adición de nuevos rasgos a través de la integración direccionada mediante la recombinación homóloga.

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

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

(A) Genes Vegetales de Resistencia a Enfermedades. Las defensas de los vegetales a menudo se activan por interacción específica entre el producto de un gen de resistencia a enfermedades (R) en el vegetal y el producto de un gen de avirulencia correspondiente (Avr) en el patógeno. Una variedad vegetal puede ser transformada con el gen de resistencia clonado para crear vegetales que sean resistentes a cepas patógenas específicas. Los ejemplos de dichos genes incluyen, el gen Cf-9 del tomate para la resistencia a

15

20

Cladosporium fulvum (Jones et ál., 1994 Science 266:. 789), el gen Pto del tomate, que codifica una proteína quinasa, para la resistencia a Pseudomonas syringae pv. tomato (Martin. et ál, 1993 Science 262:. 1432), y el gen RSSP2 de
5 Arabidopsis para la resistencia a Pseudomonas syringae (Mindrinos et ál., 1994 Cell 78: 1089).

(B) Una proteína de Bacillus thuringiensis, un derivado de esta o un polipéptido sintético modelado sobre esta, como por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de un gen de la
10 endotoxina d (Geiser et ál, 1986 Gen 48: 109), y un gen de insecticida vegetativo (VIP) gen (véase, por ejemplo, Estruch et ál. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:5389-94). Además, las moléculas de ADN que codifican genes de la endotoxina d se pueden adquirir en American Type Culture Collection
15 (Rockville, Md.), bajo los números de acceso de ATCC 40098, 67136, 31995 y 31998.

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

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

5,659,026.

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

(F) Una hormona específica de los insectos o una feromona tal como un ecdiesterioide y una hormona juvenil y una variante de estos, un mimético a base de estos, o un antagonista o agonista de estos, tal como, la expresión en baculovirus de la hormona juvenil clonada esterasa, un inactivador de la hormona juvenil (Hammock et ál., 1990 Nature 344:458).

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

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

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

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

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

(L) Un péptido de momento hidrofóbico. Véanse las patentes estadounidenses n.º 5,659,026 y 5,607,914; la última muestra péptidos antimicrobianos sintéticos que confieren resistencia
10 a enfermedades.

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

Una proteína viral invasiva o una toxina compleja derivada de ella. Por ejemplo, la acumulación de proteínas virales de cubierta en células vegetales transformadas proporciona resistencia a la infección viral y/o al desarrollo de
20 enfermedades efectuado por el virus del que deriva el gen de la proteína de cubierta, así como mediante virus relacionados. La resistencia mediada por proteínas de

cubierta se ha conferido a plantas transformadas contra el virus del mosaico de la alfalfa, virus del mosaico del pepino, virus estriado del tabaco, virus X de la papa, virus Y de la papa, virus del grabado del tabaco, virus cascabel del tabaco y virus del mosaico del tabaco. Véase, por ejemplo, Beachy et ál. (1990) Ann. Rev. Phytopathol. 28:451.

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

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

(Q) Una proteína que detiene el desarrollo, producida en la naturaleza por un patógeno o un parásito. De este modo, las endo- α -1,4-D-poligalacturonasas fúngicas facilitan la

colonización fúngica y la liberación de nutrientes vegetales al solubilizar la homo-a-1,4-D-galacturonasa de la pared celular del vegetal (Lamb et ál., 1992) Bio/Technology 10:1436. La clonación y caracterización de un gen que
5 codifica una proteína inhibidora de endopoligalacturonasa de haba se describe por Toubart et ál. (1992 Plant J. 2:367).

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

(S) Interferencia de ARN, en la que una molécula de ARN se utiliza para inhibir la expresión de un gen objetivo. Una molécula de ARN en un ejemplo tiene cadena doble parcial o
15 totalmente, lo que desencadena una respuesta de silenciamiento, dando como resultado la escisión del RNAd en pequeños ARN de interferencia, que luego se incorporan en un complejo direccionado que destruye los ARNm homólogos. Véanse, por ejemplo, Fire et ál., patente estadounidense n.º
20 6,506,559; Graham et ál., patente estadounidense n.º 6,573,099.

2. Genes que confieren resistencia a un herbicida

Genes que codifican la resistencia o tolerancia a un herbicida que inhibe el punto de crecimiento o meristemo, tal como un herbicida de imidazolinona, sulfonanilida o sulfonilurea. Los genes de ejemplo en esta categoría
5 codifican el acetolactato sintasa mutante (ALS) (Lee et ál., 1988 EMBOJ. 7:1241) también conocido como enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) (Miki et ál., 1990 Theor. Appl. Genet. 80:449).

(B) Uno o más genes adicionales que codifican la resistencia
10 o tolerancia al glifosato impartidas por los genes de la sintasa EPSP mutante y genes aroA, o a través de la inactivación metabólica mediante genes tales como DGT-28, 2mEPSPS, GAT (acetiltransferasa glifosato) o GOX (glifosato oxidasa) y otros compuestos de fosfono tales como glufosinato
15 (genes pat, bar, y DSM-2), y ácidos ariloxifenoxipropionicos y ciclohexanodionas (genes que codifican el inhibidor de ACCasa). Véase, 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 al glifosato.
20 Una molécula de ADN que codifica un gen aroA mutante se puede obtener con el número de acceso de ATCC 39256, y la secuencia de nucleótidos del gen mutante se describe en la patente

estadounidense n.º 4,769,061. La solicitud de patente europea n.º 0 333 033 y la patente estadounidense n.º 4,975,374 describen secuencias de nucleótidos de genes de glutamina sintetasa que confieren resistencia a herbicidas tales como L-fosfinotricina. La secuencia de nucleótidos de un gen de fosfinotricinacetil-transferasa se proporciona en la solicitud de patente europea n.º 0 242 246. De Greef et ál. (1989) Bio/Technology 7:61, describe la producción de plantas transgénicas que expresan genes bar quiméricos que codifican la

10 actividad de la fosfinotricinacetil-transferasa. Son ejemplos de genes que confieren resistencia a ácidos ariloxifenoxi propiónicos y a ciclohexanodionas, tales como setoxidim y haloxifop, los genes Acc1-S1, Acc1-S2 y Acc1-S3 descritos por Marshall et ál. (1992) Theor. Appl. Genet. 83:435.

(C) Genes que codifican la resistencia o tolerancia a un herbicida que inhibe la fotosíntesis, tal como una triazina (genes psbA y gs+) o un benzonitrilo (gen de nitrilasa).

20 Przibilla et ál. (1991) Plant Cell 3:169 describe la transformación de Chlamydomonas con plásmidos que codifican genes psbA mutantes. Las secuencias de nucleótidos para genes

de nitrilasa están descritas en la patente estadounidense n.º 4,810,648 y las moléculas de ADN que contienen estos genes están disponibles con los números de acceso de la ATCC 53435, 67441 y 67442. La clonación y expresión de ADN que codifica
5 una glutatona S-transferasa se describe en Hayes et ál. (1992) Biochem. J. 285:173.

(D) Genes que codifican la resistencia o tolerancia a herbicidas que se unen a enzimas de hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD), que catalizan la reacción en la cual el
10 para-hidroxifenil piruvato (HPP) se transforma en homogentisato. Esto incluye herbicidas tales como isoxazolas (EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, patente estadounidense n.º 5,424,276), en particular isoxaflutola, que es un herbicida selectivo para el maíz,
15 dicetonitrilos (EP496630, EP496631), en particular 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃ fenil)propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂fenil)propano-1,3-diona, tricetonas (EP625505, EP625508, patente estadounidense n.º 5,506,195), en particular sulcotriona y pirazolinatos. Un
20 gen que produce una sobreabundancia de HPPD en los vegetales puede proporcionar tolerancia o resistencia a dichos herbicidas, incluidos, por ejemplo, los genes descritos en

las patentes estadounidenses n.º 6,268,549 y 6,245,968 y la publicación de la solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0066102.

(E) Genes que codifican la resistencia o tolerancia a los herbicidas de fenoxi auxina, tales como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y que también pueden conferir resistencia o tolerancia a herbicidas de ariloxifenoxipropionato (AOPP). Los ejemplos de estos genes incluyen el gen de la enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (aad-1), que se describe en la patente estadounidense n.º 7,838,733.

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

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

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

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

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

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

(B) Disminución del contenido de fitasa

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

(2) Un gen que reduzca el contenido de fitato podría ser

introducido. En el maíz, esto, por ejemplo, podría llevarse a cabo mediante la clonación y luego la reintroducción de ADN asociado con el alelo único que es responsable de los mutantes de maíz caracterizados por bajos niveles de ácido fítico (Raboy et ál., 1990 Maydica 35:383).

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

20 **Transformación**

Los métodos adecuados para la transformación de plantas incluyen cualquier método por el cual se pueda introducir ADN

a una célula, por ejemplo y de modo no taxativo: electroporación (ver, por ejemplo, patente estadounidense 5,384,253); bombardeo de microproyectiles (ver, por ejemplo, patentes estadounidenses 5,015,580, 5,550,318, 5,538,880, 5 6,160,208, 6,399,861 y 6,403,865); transformación mediada por *Agrobacterium* (ver, por ejemplo, patentes estadounidenses 5,635,055, 5,824,877, 5,591,616; 5,981,840 y 6,384,301) y transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, patente estadounidense 5,508,184). Estos métodos pueden utilizarse
10 para transformar de manera estable o transformar de manera transitoria una planta.

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

2009/0104700, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia).

Además, la transferencia de genes se puede llevar a cabo usando virus o bacterias que no sean de *Agrobacterium* tales como *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, virus X de la papa, virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico de la vena de la yuca y/o virus del mosaico de tabaco, véase, por ejemplo, Chung et ál. (2006) *Trends Plant Sci.* 11(1):1-4.

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

estadounidenses 7,060,876 y 5,591,616 y la publicación internacional PCT W095/06722.

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

Las células que sobreviven a la exposición a un agente
15 selectivo, o las células que han sido calificadas como positivas en un ensayo de análisis se pueden cultivar en un medio que tolerar la regeneración de plantas. En una modalidad, cualquier medio de cultivo de tejido vegetal adecuado se puede modificar incluyendo sustancias adicionales,
20 tales como reguladores de crecimiento. Los tejidos vegetales pueden mantenerse en un medio básico con reguladores de crecimiento hasta que esté disponible tejido suficiente para

comenzar los esfuerzos de regeneración de la planta. De manera alternativa, siguiendo repetidas veces de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea la adecuada para la regeneración (por ejemplo, al menos 2 semanas), el
5 tejido puede transferirse al medio propicio de formación de tallos. Los cultivos se transfieren periódicamente hasta que se haya producido suficiente formación de tallos. Una vez que se hayan formado los tallos, se transfieren al medio propicio para la formación de raíces. Una vez que se hayan formado
10 suficientes raíces, las plantas pueden transferirse a la tierra para que crezcan y maduren.

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

completa.

Se pueden analizar los eventos transgénicos, por ejemplo, mediante la amplificación por PCR usando cebadores de oligonucleótidos específicos para las moléculas de ácido nucleico de interés. Se entiende que la genotipificación incluye, de modo no taxativo, la amplificación por PCR del ADN genómico derivado de los tejidos aislados y/o purificados de tejidos de plantas hospedadoras que se prevé que contengan una molécula de ácido nucleico de interés integrada en el genoma, seguido de la clonación estándar y el análisis de secuencia de productos de amplificación por PCR. Los métodos de genotipificación por PCR han sido bien descritos (ver, por ejemplo, Rios et ál. (2002) Plant J. 32:243-53) y se pueden aplicar al ADN genómico derivado de cualquier especie vegetal o tipo de tejido, inclusive cultivos celulares.

Las combinaciones de cebadores de oligonucleótido que unen tanto a la secuencia objeto como a la secuencia introducida se pueden usar secuencialmente o multiplexados en reacciones de amplificaciones por PCR. Se pueden producir los cebadores de oligonucleótido diseñados para hibridarse al sitio objeto, secuencias de ácido nucleico introducidas y/o combinaciones de los dos tipos de secuencias de ácido nucleico. Por lo tanto,

las estrategias de genotipificación por PCR pueden incluir, por ejemplo y de modo no taxativo: amplificación de secuencias específicas en el genoma de la planta; amplificación de secuencias específicas múltiples en el genoma de la planta; amplificación de las secuencias no específicas en el genoma de la planta; y combinaciones de cualquiera de los anteriores. Un experto en la técnica podrá elaborar combinaciones adicionales de los cebadores y reacciones de amplificación para examinar el genoma. Por ejemplo, se puede diseñar un conjunto de cebadores de oligonucleótidos inversos y hacia adelante para hibridarse a las secuencias de ácido nucleico específicas para el objetivo fuera del límite de la secuencia de ácido nucleico introducida.

Los cebadores de oligonucleótido inversos y hacia adelante se pueden diseñar para hibridarse específicamente a una molécula de ácido nucleico introducida, por ejemplo, en una secuencia que corresponde a una región codificante dentro de una secuencia de nucleótidos de interés comprendida allí, u otras partes de la molécula de ácido nucleico. Los cebadores se pueden usar conjuntamente con cebadores descritos en la presente. Los cebadores de oligonucleótidos se pueden sintetizar de acuerdo con una secuencia deseada y están

comercialmente disponibles (por ejemplo, de Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA). La amplificación puede estar seguida de clonación y secuenciación, o mediante el análisis de secuencia directo de productos de amplificación.

5 En una modalidad, los cebadores de oligonucleótidos específicos para direccionar genes se utilizan en amplificaciones por PCR.

Método para expresar un transgén

10 En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 2), unido de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un
15 tejido vegetal o célula vegetal comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 2), unido de manera operativa a al menos un transgén.

En una modalidad, un método para expresar al menos un
20 transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 2), unido de

manera operativa a al menos un transgén. En otra modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 2), unido de manera operativa a al menos un transgén.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 2, unido de manera operativa a un transgén. Donde el promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 2) está comprendido por un promotor anterior (SEQ ID NO: 4), una 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) y un intrón (SEQ ID NO: 8). En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor anterior Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 4), una 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) y un intrón (SEQ ID NO: 8). En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor anterior Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 4), una 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) y un intrón (SEQ ID NO: 8) de un gen Ubi-1 de *Z. luxurians* v2. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula

vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor anterior Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 4), una 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) y un intrón (SEQ ID NO: 8) de un gen Ubi-1 de *Z. luxurians* v2.

- 5 En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 En una modalidad, un promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 puede ser la SEQ ID NO: 2. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión
- 10 génica que comprende un promotor, donde el promotor es idéntico en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 2. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que
- 15 comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 que se encuentra unido de manera operativa a un transgén. En una modalidad ilustrativa, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 que se
- 20 encuentra unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de

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

- 5 En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un promotor anterior de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 En una modalidad, un promotor anterior de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 puede ser la SEQ ID NO: 4. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal
- 10 comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor anterior, donde el promotor anterior es idéntico en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 4. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula
- 15 vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor anterior de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 que se encuentra unido de manera operativa a un transgén. En una modalidad ilustrativa, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que
- 20 comprende un promotor anterior de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 que se encuentra unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas,

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

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un intrón de Ubi-1. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende una secuencia 5'-UTR o líder de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2. En una modalidad, una secuencia 5'-UTR o líder de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 puede ser un polinucleótido de la SEQ ID NO: 6. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR o una secuencia líder, donde el 5'-UTR o la secuencia líder son idénticos en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 6. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un 5'-UTR o líder Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 que está unida de manera operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 o un promotor que tiene origen en una planta (por ejemplo, el promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays* o *Zea luxurians*), un virus

(por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un 5'-UTR o líder de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 que se encuentra unido de manera operativa a un transgén. En una modalidad ilustrativa, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal que comprende un casete de expresión génica que comprende un 5'-UTR o líder de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 que se encuentra unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un intrón de Ubi-1. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un intrón de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2. En una modalidad, un intrón de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 puede ser un polinucleótido de la SEQ ID NO: 8. En una modalidad, una planta, un tejido

vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un intrón, donde el intrón es idéntico en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO: 8.

5 En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 que está unida de manera operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 o un promotor que tiene origen en una planta (por ejemplo, el promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays*
10 o *Zea luxurians*), un virus (por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un
15 intrón de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 que se encuentra unido de manera operativa a un transgén. En una modalidad ilustrativa, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal que comprende un casete de expresión génica que comprende un intrón de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 que se encuentra unido de
20 manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso

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

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor anterior de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2, un intrón de Ubi-1 y un 5'-UTR de Ubi-1 que se encuentra unido de manera operativa a un transgén. El promotor anterior de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2, el intrón de Ubi-1 y la 5'-UTR de Ubi-1 pueden estar unidos de manera operativa a diferentes transgenes dentro de un casete de expresión génica cuando un casete de expresión génica incluye dos o más transgenes. En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un promotor de Ubi-1 *Z. luxurians* v2 que se encuentra unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un intrón de Ubi-1 *Z. luxurians* v2 que se encuentra

unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 que está unida de manera operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 o un promotor que tiene origen en una planta (por ejemplo, el promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays* o *Zea luxurians*), un virus (por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un 5'-UTR de Ubi-1 *Z. luxurians* v2 que se encuentra unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador

seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un vector que comprende un elemento génico constitutivo regulador del promotor, tal como se describe en

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

15 En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal de acuerdo con los métodos que se describen en la presente, puede ser una monocotiledónea. La planta monocotiledónea, tejido vegetal, célula vegetal, puede ser, de modo no taxativo, maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, cebada,
20 centeno, sorgo, orquídea, bambú, banana, totora, lirio, avena, cebolla, mijo y triticale. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal de acuerdo con los métodos

que se describen en la presente, puede ser una dicotiledónea. La planta dicotiledónea, tejido vegetal o célula vegetal puede ser, de modo no taxativo, colza, canola, mostaza india, mostaza etíope, soja, girasol y algodón.

5 Con respecto a la producción de plantas modificadas genéticamente, son conocidos en la técnica los métodos para la modificación genética de las plantas. Por ejemplo, se han desarrollado numerosos métodos para la transformación de plantas, inclusive protocolos de transformación biológica y
10 física para plantas dicotiledóneas, así como para plantas monocotiledóneas (por ejemplo, Goto-Fumiyuki et ál., *Nature Biotech* 17:282-286 (1999); Miki et ál., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. y Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 67-88 (1993)).
15 Adicionalmente, se encuentran disponibles vectores y métodos de cultivo *in vitro* para la transformación y regeneración de células o tejidos vegetales de plantas, por ejemplo, en Gruber et ál., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. y Thompson, J. E. Eds., CRC
20 Press, Inc., Boca Raton, pp. 89-119 (1993).

El experto en la técnica reconocerá que luego de incorporar de forma estable la secuencia exógena en plantas transgénicas

y confirmar que es operativa, puede ser introducida en otras plantas mediante cruzamiento sexual. Puede usarse un gran número de técnicas estándares de fitomejoramiento, dependiendo de las especies que se pretenda cruzar.

5 Se puede identificar y aislar una célula vegetal, raíz, hoja, callo, polen, tejido o planta transformados mediante la selección o análisis del material vegetal modificado para obtener rasgos codificados por los genes marcadores presentes en el ADN transformador. Por ejemplo, la selección puede
10 realizarse mediante el cultivo del material vegetal modificado en medios que contengan una cantidad inhibitoria del antibiótico o herbicida al cual ofrece resistencia la construcción génica transformadora. Además, las células transformadas también pueden ser identificadas mediante la
15 selección de actividades de genes marcadores visibles (por ejemplo, los genes YFP, GFP, β -glucuronidasa, luciferasa, B o C1) que pueden estar presentes en construcciones recombinantes de ácido nucleico. Dichas metodologías de selección y análisis son conocidas para el experto en la
20 materia.

Pueden usarse también métodos físicos y bioquímicos para identificar transformantes de plantas o de células vegetales

que contienen construcciones génicas insertadas. Estos métodos incluyen, de modo no taxativo: 1) El análisis Southern o la amplificación PCR para detectar y determinar la estructura del inserto de ADN recombinante; 2) transferencia Northern, la protección de RNasa S1, la extensión del cebador o la amplificación PCR con transcriptasa inversa para detectar y examinar las transcripciones de ARN de las construcciones génicas; 3) los ensayos enzimáticos para detectar la actividad enzimática o ribozimática, donde dichos productos génicos están codificados por la construcción génica; 4) el análisis de secuenciación de la próxima generación (NGS); o 5) la electroforesis de proteínas en gel, las técnicas de transferencia Western, la inmunoprecipitación o el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), donde los productos de la construcción génica son proteínas. Pueden usarse también técnicas adicionales, tales como hibridación *in situ*, tinción de enzimas e inmunotinción, para detectar la presencia o expresión de las construcciones recombinantes en órganos y tejidos vegetales específicos. Los métodos para llevar a cabo todos estos ensayos son conocidos para el experto en la técnica. Pueden observarse los efectos de la manipulación genética

mediante el uso de los métodos divulgados en la presente, a través de, por ejemplo, análisis transferencia Northern del ARN (por ejemplo, ARNm) aislado de los tejidos de interés. Típicamente, si se encuentra presente el ARNm o la cantidad de ARNm ha aumentado, puede asumirse que el transgén correspondiente está siendo expresado. Pueden usarse otros métodos para la medición de la actividad genética y/o de polipéptidos codificados. Pueden usarse diferentes tipos de ensayos enzimáticos, dependiendo del sustrato utilizado y el método para la detección del aumento o disminución de un producto o subproducto de reacción. Además, los niveles expresados de polipéptidos pueden medirse de forma inmunoquímica, empleando ELISA, RIA, EIA y otros ensayos basados en anticuerpos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los ensayos de detección electroforética (ya sea por tinción o transferencia Western). Como un ejemplo no taxativo, se describe la detección de las proteínas AAD-1 (ariloxialcanoato dioxigenasa; ver WO 2005/107437) y PAT (fosfinotricina-N-acetiltransferasa) usando un ensayo ELISA en la publicación de patente estadounidense n.º 20090093366, la cual se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad. Además, el transgén puede

expresarse de manera selectiva en algunos tipos de células o tejidos de la planta o en algunas etapas del desarrollo. Además, el transgén puede expresarse sustancialmente en todos los tejidos vegetales y durante su ciclo de vida completo.

5 No obstante, también es aplicable cualquier modo de expresión combinatoria.

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

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

20

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación y aislamiento del promotor novedoso

Una secuencia de un promotor novedoso a partir del gen Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 se amplificó usando la reacción de la cadena polimerasa PCR). Los oligonucleótidos (Tabla 1) diseñados para amplificar el promotor novedoso, de *Z. luxurians* v2, se derivaron de regiones conservadas de la secuencia del promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73, que sirvió como control. Se obtuvo un producto PCR a partir de *Z. luxurians* v2 y se caracterizó.

El producto PCR que comprendía el promotor novedoso se clonó en vectores Topo™ usando un kit de clonación PCR Invitrogen Zero Blunt® TOPO® de conformidad con las instrucciones del fabricante. Se proporciona un mapa del vector que muestra el plásmido clonado que comprende el producto PCR del promotor novedoso. El plásmido pDAB105710 corresponde a *Z. luxurians* v2 (FIG. 2).

Tabla 1: Cebadores usados para la amplificación por PCR de los promotores de Ubi-1 novedosos	
5	Cebador directo: GCTACCGCGG<u>ACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATG</u> Cebador inverso: AGTCAGGTACCCTGCAGAAGTAACACCAAACAACAG
10	Seq. ID No: 9 10
La secuencia específica del promotor de los cebadores PCR está subrayada. La secuencia del cebador ubicada 5' hacia adelante de la secuencia específica del promotor es la	

Después de la clonación, el inserto del promotor que contenía el producto PCR se secuenció usando métodos conocidos para los expertos en la técnica. Las secuencias de polinucleótidos del promotor de *Z. luxurians* v2 (FIG. 4) fueron alineadas de manera computacional y posteriormente analizadas para obtener la homología de secuencia con respecto a la secuencia de control de Ubi-1 *Z. mays* c.v. B73 (FIG. 3). Se usaron métodos bioinformáticos y/o programas de software conocidos para los expertos en la técnica, tales como ClustalIW o Sequencher, para realizar el análisis de homología de la secuencia.

Ejemplo 2: Caracterización del promotor novedoso

El análisis de homología de la secuencia (FIGS. 3-7),
5 incluidos el alineamiento y la comparación de la secuencia
con respecto a la secuencia de control de Ubi-1 de *Z. mays*
c.v. B73 (SEQ ID NO: 1; FIG. 3) reveló un promotor novedoso
de Ubi-1 para caracterización adicional. También se observó
que la secuencia del nuevo promotor de Ubi-1, obtenido a
10 partir de *Z. luxurians* v2 (SEQ ID NO: 2; FIG. 4), comprendía
secuencias de polinucleótidos de tres regiones distintas; 1)
una región del promotor anterior (SEQ ID NO: 4), 2) una 5'-
UTR (SEQ ID NO: 6), y 3) un intrón (SEQ ID NO: 8). Las
regiones del promotor y los elementos específicos del
15 promotor de *Z. luxurians* v2 se analizaron para obtener la
homología de la secuencia de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v.
B73 (FIGS. 5-7). Más específicamente, el alineamiento de la
secuencia se realizó para comparar de manera independiente
las regiones del promotor anterior, de la 5'-UTR y del
20 intrón, así como los elementos reguladores de la caja TATA y
el elemento de choque térmico (HSE) del promotor de *Z.*
luxurians v2 con respecto a las regiones correspondientes de

la secuencia de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIGS. 5-7, Tabla 2).

Tabla 2: Homología de la secuencia (%) entre el promotor de Ubi-1 de <i>Z. mays</i> c.v. y el promotor novedoso de Ubi-1						
Promotor 5'-				Elemento		
Promotor	Total	anterior	UTR/Líder	Intrón	TATA	Caja de choque térmico
<i>Z. luxurians</i> v2	92.7	92.7	95.2	92.4	100	100

La FIG. muestra el alineamiento de la secuencia de las regiones del promotor anterior del promotor de *Z. luxurians* v2, en comparación con la región del promotor anterior de la secuencia del promotor de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. La FIG. 6 muestra el alineamiento de la secuencia de la 5'-UTR o la secuencia líder del promotor de *Z. luxurians* v2, en comparación con la 5'-UTR o la secuencia líder de la secuencia del promotor de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. La FIG. 7 muestra el alineamiento de la secuencia de las regiones de intrones del promotor de *Z. luxurians* v2, en

comparación con la secuencia de intrones de la secuencia del promotor de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73.

Los elementos del promotor obtenidos de *Z. luxurians* v2 mostraron una identidad de secuencia total de 92.7% (Tabla 2)

5 con respecto a la secuencia de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73.

La caracterización de la secuencia del promotor novedoso de *Z. luxurians* v2 confirmó que la mayoría de los elementos reguladores del promotor (es decir, una caja TATA o un elemento de choque térmico) usualmente presentes en un

10 promotor funcional, estaban también altamente conservados dentro de las regiones del promotor nuclear del promotor de *Z. luxurians* v2 (Tabla 2). Por ejemplo, la FIG. 5 muestra

una caja TATA altamente conservada (pares de bases 868-874 que se muestran en subrayado) que se identificó y se encontró

15 que estaba ubicada aproximadamente a 50bp 5' hacia adelante del TSS en la región del promotor anterior del promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2.

De manera similar, la FIG. 5 muestra dos secuencias superpuestas de elementos de choque térmico (HSE) (pares de bases 456-480, respectivamente, que

20 se muestran en un círculo) que se conservaron en el promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 se analizaron en este estudio.

Mientras que solo se observaron los niveles bajos de

variación en la secuencia 5'-UTR o líder del promotor novedoso de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (FIG. 4) que tenía una homología de secuencia de 95.2% con respecto a la secuencia de control de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIG. 6), las áreas

5 de menor conservación de la secuencia en la región del promotor anterior (FIG. 5) y la región del intrón (FIG. 7) también se identificaron. Por ejemplo, las regiones promotoras anteriores del promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 mostraron una variación con respecto al promotor anterior

10 de Ubi-1 de *Zea mays* c.v. B73, que tenía una homología de secuencia de 92.7 % (Tabla 2). La mayoría de las diferencias identificadas en la región promotora anterior de *Z. luxurians* v2 comprendían eliminaciones, sustituciones y/o desajustes (FIG. 5). En particular, una eliminación de 12-13bp ubicada

15 a 100bp 5' hacia adelante del promotor de la caja de TATA se encontró en el promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (FIG. 5, pares de bases 776-787 que se muestran recuadradas).

Además, existían motivos reguladores adicionales en la región del promotor anterior de Ubi-1 que se extiende a 100-200bp 5'

20 hacia adelante del TSS. Estos motivos unen factores de transcripción que interactúan con el complejo de inicio de la transcripción y facilitan su montaje, mejoran su estabilidad,

o aumentan la eficiencia del escape del promotor una vez que la maquinaria de transcripción se activa (PEREMARTI *et al.* 2010). Por lo tanto, las eliminaciones, sustituciones, y los desajustes dentro de esta región reguladora, tal como se observó en el promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (FIG. 5), podrían potencialmente afectar tanto a la fuerza del promotor como a su especificidad.

La variación de la secuencia también se identificó en las regiones de intrones del promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2. Mientras que el promotor novedoso de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 compartía niveles relativamente conservados de identidad de secuencia (es decir, 92.4%) con la secuencia promotora de control de Ubi-1 *Z. mays* c.v. B73 (Tabla 2), la secuencia promotora de intrones de *Z. luxurians* v2 también contenía dos eliminaciones significativas de aproximadamente 17bp y 8bp, respectivamente (FIG. 7), que no se identificaron en la secuencia de control. La eliminación de 17bp se ubicaba aproximadamente a 195bp 3' posterior de TSS (pares de bases 120-136, que se muestran recuadradas) y la eliminación de 8bp se ubicaba aproximadamente a 710bp 3' posterior de TSS (pares de bases 627-634, que se muestran subrayadas)

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

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

Los promotores de *Z. luxurians* que comprenden las regiones del promotor anterior, 5'-UTR, y de intrones, tal como se describe anteriormente, se extrajeron a partir del gen Ubi-1 de las especies de *Z. luxurians* y los amplicones de PCR se purificaron en gel usando el Kit de Extracción de Gel QIAquick® (Qiagen Carlsbad, CA). La secuencia de polinucleótidos promotora se clonó a continuación en un Vector de Entrada Gateway® (Invitrogén) utilizando técnicas de clonación estándares conocidas en la técnica. El Vector de Entrada Gateway® resultante que comprendía la secuencia promotora de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 se confirmó mediante digestión de restricción y secuenciación. Un vector de

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

5 Además de las secuencias promotoras de Ubi-1, el vector de entrada también comprendía el gen indicador de la *proteína fluorescente amarilla* a partir de las especies de *Phialidium*(*PhiYFP*; Shagin, D. A., (2004) *Mol Biol Evol.* 21;841-50) con un intrón ST-LS1 incorporado a la secuencia
 10 (Vancanneyt, G., (1990) *Mol Gen Genet.* 220;245-50) y la región 3'-UTR del gen de la *Zea mays* Peroxidasa 5 (*ZmPer5*; patente estadounidense n.º 6,699,984). Se proporcionan mapas de vectores que muestran los vectores de entrada clonados que comprenden cada secuencia promotora. La construcción
 15 pDAB105742 corresponde al vector de entrada de control que comprende la secuencia promotora de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. La construcción pDAB105738 corresponde al vector de entrada de control que comprende la secuencia promotora de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 Por lo tanto, se establecieron los vectores de
 20 entrada que comprendían casetes de expresión génica que comprendían un promotor de Ubi-1 de especies de *Zea* , el gen *PhiYFP*, y el *ZmPer5* 3'-UTR.

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

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

Tabla 3: Construcción del vector binario de expresión génica							
	Construcción del vector de entrada			Construcción del vector de destino			
Construcción del vector binario	Promotor	Transgén	3' -UTR	Promotor	Gen indicador	3' -UTR	Figura
pDAB105748	<i>Z. mays</i> c.v. B73 Ubi-1	<i>PhiYFP</i>	<i>ZmPer5</i>	<i>Z. mays</i> Ubi-1	PAT	<i>ZmLip</i>	8
pDAB105744	<i>Z. luxurians</i> v2 Ubi-1	<i>PhiYFP</i>	<i>ZmPer5</i>	<i>Z. mays</i> Ubi-1	PAT	<i>ZmLip</i>	9

La reacción de recombinación Gateway® permitió la inserción de cada vector de entrada que comprendía el casete de expresión génica (es decir, un promotor de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 o *Z. mays* c.v. B73, el gen *PhiYFP*, y la 3'-UTR de *ZmPer5*) en el vector binario de destino pDAB101917. Los vectores de entrada se insertaron en el vector de destino pDAB101917 entre las fronteras A y B del ADN-T, y en la parte

anterior del casete de expresión PAT.

Se proporcionan mapas de los vectores que mostraron la construcción de expresión binaria, pDAB101917, con los casetes de expresión génica compuestos de un promotor de Ubi-1 *Z. mays* o *Z. luxurians*, el gen *PhiYFP*, y el *ZmPer5* 3'-UTR incorporados. La construcción de control, pDAB105748, corresponde al casete de expresión génica que comprende el promotor de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (FIG. 8). Además, la construcción pDAB105744 corresponde al casete de expresión génica que comprende la secuencia promotora de Ubi-1 de *Z. luxurians* v2 (FIG. 9).

Ejemplo 4: Transformación de la planta

Las construcciones de vectores binarios, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73), y pDAB105744 (*Z. luxurians* v2) fueron transformadas cada una en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, EHA101, usando técnicas de transformación estándares conocidas en la técnica. Se aislaron las colonias bacterianas y el ADN plasmídico binario se extrajo, purificó y confirmó mediante la digestión de la enzima de restricción.

La transformación de las plantas de maíz se llevó a cabo de conformidad con el protocolo descrito en Vega et ál., 2008,

Plant Cell Rep 27:297-305 que empleó transformación mediada por *Agrobacterium* y el gen de *fosfinotricin acetiltransferasa* (PAT; Wehrmann *et ál.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14:1274-1278) como un marcador vegetal seleccionable. Se usaron

5 cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* que comprendían las construcciones de vectores binarios (descritas anteriormente) para transformar las plantas de *Z. mays* c.v. Hi-II y producir una primera tanda de eventos de maíz transgénico, T₀ (Tabla 4). Los embriones cigotos inmaduros se produjeron,

10 prepararon y cosecharon 2.5 meses después de la transformación.

Los resultados de la transformación para las construcciones de expresión génica individuales se describen adicionalmente en la Tabla 4. Se describe la cantidad total de embriones

15 producidos, la cantidad total de eventos transgénicos observados en la etapa de callos y en la planta completa, así como el porcentaje de la eficiencia general de transformación. La eficiencia general de transformación de las construcciones de expresión binaria es menor que la que

20 se informó previamente (Vega *et ál.*, 2008) debido a vigor embrionario pobre en varios experimentos.

Tabla 4: Primera tanda, T₀, resultados de la transformación del maíz

5	Construcción del vector binario	N.º total de embriones	Cantidad de callos	Número de eventos transgénicos	Eficiencia (%)
	pDAB105748	545	221	33	6.1
	pDAB105744	955	242	8	0.8

Ejemplo 5: Análisis del número de copias de transgenes

10 La integración estable del transgén *PhiYFP* dentro el genoma de las plantas transgénicas de *Z. mays* se confirmó mediante un ensayo de sonda de hidrólisis. Se obtuvieron plántulas transgénicas de *Z. mays* transformadas de forma estable que se desarrollaron a partir de los callos y se analizaron para

15 identificar eventos que contuvieran un número bajo de copias (es decir, 1-2 copias) de insertos de cadena T de longitud completa.

Se utilizó el sistema Roche Light Cycler480™ para determinar el número de copias del transgén de conformidad con las

20 instrucciones del fabricante. El método utilizó una reacción de PCR bíplice TaqMan® que empleó oligonucleótidos específicos para el gen *PhiYFP* y para el gen de referencia endógeno, *Z.*

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

Se amplificó un fragmento de ADN de *PhiYFP* específico al gen con un conjunto de cebadores/sondas TaqMan® que contenía una sonda etiquetada con colorante fluorescente FAM™; se
10 amplificó una *ZmInv* con un segundo conjunto de cebadores/sondas TaqMan® que contenía una sonda etiquetada con fluorescencia HEX™ (Tabla 5). Los cebadores y las sondas para el análisis del número de copias fueron sintetizadas comercialmente mediante Tecnología de ADN integradas
15 (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 por PCR en un volumen final de reacción de 10µl usando reactivos, tal como se describe en la Tabla 6.
20 Los fragmentos específicos del ADN se amplificaron de conformidad con las condiciones de ciclo térmico establecidas en la Tabla 7. Se determinó el número de copias y la

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

Los estándares de números de copias se crearon diluyendo el vector, pDAB108706, en el ADN genómico (ADNg) de *Z. mays* c.v. B104 para obtener estándares con una relación conocida de pDAB108706:ADNg. Por ejemplo, se prepararon las muestras que
10 tenían una, dos y cuatro copias de ADN vector cada una copia del ADNg de *Z. mays* B104. Se validaron disoluciones de una y dos copias de pDAB108706 mezcladas con el estándar de ADNg de *Z. mays* B104 contra un evento de control de *Z. mays* que se sabía que era hemicigótico, y un evento de control de *Z. mays*
15 que se sabía que era homocigótico (es decir, evento 278 de *Z. mays*; ver publicación internacional de patente PCT WO 2011/022469 A2).

Se realizó un ensayo de amplificación por PCR bíplice TaqMan® que utilizó oligonucleótidos específicos para el gen PAT y
20 para el gen de referencia endógeno, *Zm Inv*, respectivamente. Se empleó amplificación por PCR para detectar un fragmento de ADN específico del gen para PAT con un conjunto de cebadores

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

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

15

20

5

10

15

Tabla 5: Cebadores y sondas para ensayos del número de copias			
Gen	Cebador/Sonda	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID No:
<i>PhiYFP</i>	Cebador hacia adelante	CGTGTTGGGAAAGAACTTGA	11
	Cebador inverso	CCGTGGTTGGCTTGGTCT	12
	Sonda (Etiqueta fluorescente/secuencia)	5' FAM/CACTCCCCACTGCCT	13
<i>ZmInv</i> de control	Cebador hacia adelante	TGGCGGACGACGACTTGT	14
	Cebador inverso	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT	15
	Sonda (Etiqueta fluorescente/secuencia)	5' HEX/CGAGCAGACCGCCGTGTA CTT	16
PAT	Cebador hacia adelante	ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGA GAGGT	17
	Cebador inverso	CTTTGATGCCTATGTGACACGTAA ACAGT	18
	Sonda (Etiqueta fluorescente/secuencia)	5' FAM/GGTGTTGTGGCTGGTATT GCTTACGCTGG	19

20

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

	Reactivo	Concentración de sustancia	Volumen (µl)	Concentra ción final
5	Agua	--	0.5	--
	Mezcla maestra Lightcycler de Roche	2X	5	1X
	Cebador directo de <i>Phi</i> YFP	10µM	0.4	400nM
	Cebador inverso de <i>Phi</i> YFP	10µM	0.4	400nM
10	Sonda etiquetada con FAM de <i>Phi</i> YFP	5 µM	0.4	200nM
	Cebador directo de <i>Zm</i> Inv	10µM	0.4	400nM
	Cebador inverso de <i>Zm</i> Inv	10µM	0.4	400nM
	Sonda etiquetada con HEX de <i>Zm</i> Inv	5 µM	0.4	200nM
15	Polivinilpirrolidona (PVP)	10%	0.1	0.10%
	Molde de ADN genómico	~5ng/µl	2	10ng/µl

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

Etapa de la PCR	Temperatura (°C)	Tiempo	Número 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 del número de copias de transgenes de plantas transgénicas

Construcción	Eventos analizados	Simple (1-2 copias)	Complejo (>2 copias)
105748	21	15	6
105744	3	1	2

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

Las plantas se muestrearon en la etapa de desarrollo V4-5 mediante ensayos de hoja ELISA. Las muestras se tomaron en

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

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

Para el ELISA de YFP, se utilizó como estándar 1 mg/mL de Phi-YFP recombinante Evrogen (Axxora LLC, Farmingdale, NY). Se utilizó una curva estándar con un ajuste de 5 parámetros (entre los estándares de 1 ng/ml y 0,125 ng/ml) para asegurar que todos los datos se encontraran comprendidos dentro de la parte lineal de la curva. Se agregó al pocillo 100 μ L de estándar o muestra. Se utilizó una disolución mínima de 1:4 de la muestra en el amortiguador del ensayo. Se incubaron las placas durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador de placas (250 rpm; agitador Titer Plate) seguido lavado 4x con 350 μ L de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash™ 2). Se agregó a cada pocillo alrededor de 100 μ L de anticuerpo primario policlonal anti-PhiYFP de conejo Evrogen (Axxora) a 1 μ g/mL. Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas a 250 rpm seguido por lavado 4x con 350 μ L de amortiguador de lavado

(Tomtec QuadraWash™ 2). Posteriormente, 100 µL de anticuerpo secundario anti-conejo IgG HRP (Thermo Scientific) se diluyeron en una relación 1:5000 de amortiguador de bloqueo/ensayo, y se cuantificaron las proteína PAT usando un
5 kit de Envirologix (Portland, ME). Los ensayos ELISA se llevaron a cabo con múltiples diluciones de los extractos de plantas y con los reactivos e instrucciones proporcionados por los proveedores.

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

Se observó la expresión de la proteína en tejidos vegetales transgénicos. Por ejemplo, se observó la expresión de *PhiYFP* en callos de las plantas T₀ que se transformaron de manera
15 estable mediante el cocultivo con *Agrobacterium*. Las plantas transgénicas se cultivaron a partir de embriones de *Z. mays* transformados usando las construcciones de vectores binarios que comprendían el promotor novedoso, pDAB105744 (*Z. luxurians* v2, FIG. 9) y el promotor de control, pDAB105748
20 (*Z. mays* c.v. B73, FIG. 8). Se observaron los callos vegetales con un microscopio esteroscópico (*Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL*) mediante un filtro de YPF y

con una fuente luminosa de 500 nm. Las muestras representativas de la expresión estable de *PhiYFP* observadas en el tejido de los callos de las plantas de maíz transgénico T_0 que comprendían pDAB105744 en comparación con de control, pDAB105748, se muestran en la FIG. 10. Los datos confirman que el promotor novedoso que comprendía pDAB105744 (*Z. luxurians* v2), tal como se describe en la presente, es capaz de conducir una expresión consistente del gen *PhiYFP* en el tejido de los callos de las plantas transgénicas T_0 .

10 Tal como se describe en la Tabla 8, las plantas completas que contenían un número de copias bajo (es decir 1-2 copias) del transgén *PhiYFP* se cultivaron en un invernadero. En general, se usaron alrededor de cinco (5) a alrededor de diez (10) eventos por construcción y alrededor de cinco (5) plantas por

15 evento para el análisis de expresión de T_1 . Los datos de ELISA revelaron una expresión consistente de la proteína *PhiYFP* en las hojas de las plantas de maíz T_1 usando construcciones de vectores que comprendían el promotor novedoso, pDAB105744 (*Z. luxurians* v2), en comparación con la

20 construcción de control, pDAB105747 (*Z. mays* c.v. B73).

Una expresión promedio de la proteína *PhiYFP* de aproximadamente 269.9 ng/mg (+/- 88.0 ng/mg) de *PhiYFP* se

observó para las plantas T₁ que comprendían la construcción del promotor novedoso, pDAB105744 (*Z. luxurians* v2, FIG. 9), en comparación con aproximadamente 285.3 ng/mg (+/- 22.7 ng/mg) de la proteína *PhiYFP* producida por la planta de control que comprendía la construcción de control, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73, FIG. 8). Estos resultados confirman que el promotor novedoso de *Z. luxurians* v2, tal como se describe en la presente, fue útil en la producción de rasgos transgénicos a niveles altos de producción de proteínas.

Además, la expresión promedio de PAT para todas las plantas T₁ que comprendían pDAB105744 (*Z. luxurians* v2) fue aproximadamente de 206.9 ng/mg (+/- 28.5 ng/mg) en comparación con aproximadamente 105.8 ng/mg (+/- 7.4 ng/mg) de la proteína PAT producida por la planta de control que comprendía pDAB105748 del promotor de *Z. mays* c.v. B73. En general, la expresión de la proteína PAT para todas las plantas de maíz fue significativamente más baja que la expresión observada para el gen *PhiYFP* en las plantas de maíz.

La expresión de la proteína *PhiYFP* también se midió en el polen derivado de las borlas de plantas transgénicas T₁ seleccionadas que representaban cada una de las

construcciones de los promotores novedosos descritas en la presente. Tal como se muestra en la FIG. 11, el análisis de las imágenes del polen transgénico confirma que el promotor novedoso que comprendía pDAB1057447 (*Z. luxurians* v2), tal como se describe en la presente solicitud, conduce la elevada expresión de la proteína *PhiYFP* en el polen.

Ejemplo 8: Construcción de vectores

La construcción del vector de expresión binaria pDAB112854 se muestra en la FIG. 12. La construcción pDAB112854 comprendía el gen indicador *PhiYFP* y la 3'-UTR *ZmPer5* que eran conducidos por el promotor de Ubi-1 de *Zm* v2. La construcción pDAB112854 también comprendía el gen *AAD-1* v3 y la 3'-UTR *ZmLip* que eran conducidos por *Z. luxurians* v2.

La construcción pDAB112854 se creó usando las metodologías estándar que se describen en, por ejemplo, Ausubel *et al.* (1995), Sambrook *et al.* (1989), y actualizaciones de estos. Los vectores de transformación o expresión para la transformación de los embriones de maíz mediados por *Agrobacterium* se construyeron mediante el uso de métodos de clonación estándares y reacciones de recombinación Gateway®, empleando un vector binario de destino estándar y el vector

de entrada que comprendía los casetes de expresión génica, tal como se describe anteriormente.

5 Ejemplo 9: Expresión vegetal estable del transgén unido de manera operativa a los promotores novedosos

Las plantas completas que contenían un número de copias bajo (es decir 1-2 copias) del transgén *PhiYFP* se cultivaron en un invernadero. Quince (15) eventos se usaron para el análisis de expresión de T_0 , tal como se muestra en la tabla 9 (a continuación). La expresión de la proteína consistente *AAD1* se obtuvo a partir de todos los eventos analizados (ver Tabla 9).

Las plantas T_0 con una sola copia del transgén se retrocruzaron con plantas de maíz B104 de tipo salvaje para obtener semillas T_1 . Se utilizaron plantas hemicigotas T_1 para el análisis. Se analizaron tres (3) eventos por construcción y cinco (5) plantas por evento para la expresión R3 de la hoja. Se utilizaron tres (3) eventos por construcción para la otra expresión de tipo de tejido.

Las medidas cuantitativas de la proteína *AAD1* obtenida de tejido de hojas de plantas transgénicas T_1 que comprenden

construcciones de promotores novedosos se muestran en la Tabla 10 (a continuación). Los datos de la Tabla 10 confirmaron que los resultados de la expresión de T₀ (ver Tabla 9), y y mostraron adicionalmente una expresión
 5 consistentemente alta de la proteína *AAD1* en la hoja R3 y otros tejidos obtenidos de plantas que contenían los promotores novedosos descritos en la presente.

Tabla 9: Expresión de la proteína <i>AAD1</i> en hojas T₀ V4		
N.º	Evento	Proteína <i>AAD1</i> (ng/cm²)
1	112854[1] - 001.001	132.8
2	112854[1] - 003.001	6.9
3	112854[1] - 006.001	197.3
4	112854[1] - 007.001	38.4
5	112854[1] -	83.1

	008.001	
6	112854[1] - 010.001	63.9
7	112854[1] - 011.001	221.7
8	112854[1] - 013.001	71.9
9	112854[1] - 014.001	59.2
10	112854[2] - 016.001	173,7
11	112854[2] - 018.001	136.6
12	112854[2] - 019.001	98.2
13	112854[2] - 024.001	82.1
14	112854[2] - 025.001	82.7
15	112854[2] - 028.001	88.4

5

10

Tabla 10: Expresión de la proteína AAD1 en diferentes tipos de tejido de plantas T ₁								
Evento	Promedio AAD-1 (ng/mg)							
	Elote	Chala	Grano	Polen	Hoja R3	Raíz	Barba	Tallo
112854[1] -008	2811.6	1203.4	1046.1	999.1	828.2	2684.5	2747.6	3815.7
112854[2] -024	2388.7	618.2	1017.5	1108.8	1024.7	1720.7	2741.7	4484.9
112854[2] -028	2557.1	795.4	969.2	517.0	579.4	2574.7	2627.4	3131.1