

ELEMENTOS REGULADORES DE ZEA MAYS

Y USOS DE ESTOS

REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos serie número 61/930,738, presentada el 23 de enero de 2014, para "ELEMENTOS REGULADORES DE ZEA MAYS Y USOS DE ESTOS".

CAMPO TÉCNICO

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.

ANTECEDENTES

Muchas especies de plantas son capaces de transformarse con transgenes para introducir rasgos o características agronómicamente deseables. Las especies de plantas se desarrollan y/o modifican para que tengan rasgos deseables particulares. Generalmente, los rasgos deseables incluyen, por ejemplo, mejorar la calidad del 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 tolerancia a herbicidas, permitir la producción de compuestos y/o materiales de la planta útiles en la industria y/o permitir la producción de productos farmacéuticos.

Las especies de plantas transgénicas que comprenden múltiples transgenes apilados en un solo locus genómico se producen mediante tecnologías de transformación vegetal. Las tecnologías de transformación vegetal dan como resultado la introducción de un transgén en una célula vegetal, la recuperación de una planta transgénica fértil que contiene la copia integrada de manera estable del transgén en el genoma de la planta, y la posterior expresión del transgén mediante transcripción y traducción del genoma vegetal dan como resultado plantas transgénicas que poseen rasgos y fenotipos deseables. Sin embargo, se prefieren los mecanismos que permiten la producción de especies de plantas transgénicas 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 un gen de resistencia a los patógenos de modo que la proteína resistente a los patógenos se exprese 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. Adicionalmente, puede ser deseable expresar un transgén en los tejidos del tallo y la hoja de una planta.

En la presente se describen elementos reguladores del promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*. Adicionalmente, se describen construcciones y métodos que utilizan los elementos reguladores del promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*.

DESCRIPCIÓN

En la presente se describen secuencias, construcciones y métodos para expresar un transgén en células vegetales y/o tejidos vegetales. En una modalidad, la descripción se refiere al casete de expresión génica que comprende un promotor unido de manera operativa a un transgén, donde el promotor comprende un polinucleótido que se hibrida en condiciones de rigurosidad a una sonda de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con respecto a un complemento de la SEQ ID NO:2. En modalidades adicionales, el promotor comprende un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2. En modalidades adicionales, el promotor comprende un polinucleótido que comprende un intrón. En otras modalidades, el intrón tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:5. En una modalidad, el promotor comprende un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:1. En otras modalidades, el transgén unido de manera operativa codifica un polipéptido o un ARN pequeño. En una modalidad posterior, el transgén se selecciona del grupo que consiste en un transgén de resistencia insecticida, transgén de tolerancia herbicida, transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, transgén de

eficiencia del uso de agua, transgén de calidad nutricional, transgén de unión a ADN, y transgén de marcador seleccionable. En aun otra modalidad, el casete de expresión génica comprende adicionalmente una región 3' no traducida. En una modalidad, la región 3' no traducida comprende un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8. En aun otra modalidad, el casete de expresión génica comprende adicionalmente una región 5' no traducida. En otra modalidad, la región 5' no traducida comprende un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:19. En una modalidad, un vector recombinante comprende el casete de expresión génica. En un aspecto adicional de la modalidad, el vector recombinante se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial bacteriano, un virus y un bacteriófago. En una modalidad, una célula transgénica comprende el casete de expresión génica. En un aspecto posterior de la modalidad, la célula es una célula vegetal transgénica. En una modalidad, una planta transgénica comprende la célula vegetal transgénica. En un aspecto adicional de la modalidad, la planta transgénica es una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea. En otros aspectos

de la modalidad, la planta monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una planta de maíz, una planta de arroz y una planta de trigo. En una modalidad, una semilla transgénica se obtiene a partir de la planta transgénica. En una modalidad posterior, el promotor es un promotor preferido de un tejido. En una modalidad adicional, el promotor preferido de un tejido es un promotor preferido de un tejido de hoja, cáscara, tallo o barba. En aun otra modalidad, el promotor comprende una secuencia de polinucleótidos de los nucleótidos 1-1,887 de la SEQ ID NO:2.

En una modalidad, la descripción se refiere a una célula transgénica que comprende un polinucleótido sintético que se hibrida en condiciones de rigurosidad a una sonda de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con respecto a un complemento de la SEQ ID NO:2. En otra modalidad adicional, el polinucleótido sintético tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2. En modalidades adicionales, el polinucleótido sintético comprende un polinucleótido que comprende un intrón. En otras modalidades, el intrón tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la SEQ ID NO:5. En una modalidad, el polinucleótido sintético comprende un

polinucleótido con una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:1. En una modalidad adicional, la célula transgénica es una célula vegetal transgénica. En una modalidad posterior, la célula vegetal transgénica se produce por medio de un método de transformación vegetal. En una modalidad adicional, el método de transformación vegetal se selecciona del grupo que consiste en un método de transformación mediada por *Agrobacterium*, un método de transformación de biolística, un método de transformación de carburo de silicio, un método de transformación de protoplasto, y un método de transformación de liposomas. En una modalidad, una planta transgénica comprende la célula vegetal transgénica. En una modalidad adicional, la planta transgénica es una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea. En otras modalidades, la planta monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una planta de maíz, una planta de arroz y una planta de trigo. En una modalidad, una semilla transgénica se obtiene a partir de una planta transgénica. En una modalidad adicional, el promotor es un promotor preferido de un tejido. En una modalidad posterior, el promotor preferido de un tejido es un promotor preferido de un tejido de hoja, cáscara, tallo o barba. En otra modalidad,

el polinucleótido sintético comprende una secuencia de polinucleótidos de los nucleótidos 1-1,887 de la SEQ ID NO:2.

En una modalidad, la descripción se refiere a un promotor de polinucleótidos purificado, donde el promotor comprende un polinucleótido que se hibrida en condiciones de rigurosidad a una sonda de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con respecto a un complemento de la SEQ ID NO:2. En modalidades adicionales, el promotor de polinucleótidos purificado tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2. En modalidades adicionales, el promotor de polinucleótidos purificado comprende un polinucleótido que comprende un intrón. En otras modalidades, el intrón tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:5. En una modalidad, el promotor de polinucleótidos purificado comprende un polinucleótido con una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:1. En otra modalidad, el polinucleótido purificado está unido de manera operativa a un transgén. En una modalidad posterior, el transgén unido de manera operativa codifica un polipéptido o es un ARN pequeño. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende la secuencia de polinucleótidos purificada unida de manera

operativa al transgén, que está unido de manera operativa a la región 3' no traducida. En una modalidad, la región 3' no traducida comprende un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende la secuencia de polinucleótidos purificada unida de manera operativa al transgén, donde el polinucleótido purificado es una región 5' no traducida de la SEQ ID NO:19. En otra modalidad, la región 5' no traducida comprende un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:19. En otra modalidad, el transgén se selecciona del grupo que consiste en un transgén de resistencia insecticida, transgén de tolerancia herbicida, transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, transgén de eficiencia del uso de agua, transgén de calidad nutricional, transgén de unión a ADN, y transgén de marcador seleccionable. En una modalidad, un vector recombinante comprende un casete de expresión génica. En una modalidad adicional, el vector recombinante se selecciona del grupo que consiste en un vector de plásmido, un vector de cósmido y un vector de BAC. En una modalidad, una célula transgénica comprende un casete de expresión génica. En una modalidad

posterior, la célula transgénica es una célula vegetal transgénica. En una modalidad, una planta transgénica comprende una célula vegetal transgénica. En una modalidad adicional, la planta transgénica es una planta monocotiledónea. En aun otra modalidad adicional, la planta monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una planta de maíz, una planta de trigo y una planta de arroz. En una modalidad, una semilla transgénica se obtiene a partir de una planta transgénica. En una modalidad posterior, la secuencia de polinucleótidos purificada promueve la expresión preferida de un tejido de un transgén. En una modalidad adicional, la secuencia de polinucleótidos purificada promueve la expresión preferida de un tejido de hoja, cáscara, tallo o barba en un transgén. En otras modalidades, el polinucleótido purificado comprende una secuencia de polinucleótidos de los nucleótidos 1-1,887 de la SEQ ID NO:2.

En una modalidad, la descripción se refiere a un método para expresar una secuencia de codificación heteróloga en una planta transgénica, el método comprende:

- a) transformar una célula vegetal con un casete de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90

- % con la SEQ ID NO:2 unida de manera operativa con la secuencia codificante heteróloga, que está unida de manera operativa a la región 3' no traducida;
- b) aislar la célula vegetal transformada que comprende el casete de expresión génica;
 - c) regenerar una célula vegetal transformada en una planta transgénica; y,
 - d) obtener la planta transgénica, donde la planta transgénica comprende el casete de expresión génica que comprende la secuencia de polinucleótidos que comprende la SEQ ID NO:2.

En modalidades adicionales, la secuencia de polinucleótidos comprende un intrón. En otras modalidades, el intrón tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la SEQ ID NO:5. En una modalidad, la secuencia de polinucleótidos tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:1. En una modalidad adicional, la secuencia codificante heteróloga se selecciona del grupo que consiste en secuencias codificantes de resistencia insecticida, secuencias codificantes de tolerancia herbicida, secuencias codificantes de eficiencia en el uso de nitrógeno, secuencias codificantes de eficiencia

del uso de agua, secuencias codificantes de calidad nutricional, secuencias codificantes de unión a ADN, y secuencias codificantes de marcador seleccionable. En una modalidad adicional, la transformación de una célula vegetal utiliza un método de transformación vegetal. En aun otra modalidad, el método de transformación vegetal se selecciona del grupo que consiste en un método de transformación mediada por *Agrobacterium*, un método de transformación de biolística, un método de transformación de carburo de silicio, un método de transformación de protoplastos, y un método de transformación de liposomas. En otras modalidades, la planta transgénica es una planta monocotiledónea transgénica o una planta dicotiledónea transgénica. En modalidades adicionales, la planta monocotiledónea transgénica se selecciona del grupo que consiste en una planta de maíz, una planta de trigo y una planta de arroz. En una modalidad, una semilla transgénica se obtiene a partir de una planta transgénica. En una modalidad adicional, la secuencia codificante heteróloga se expresa preferentemente en un tejido. En aun otra modalidad, la secuencia codificante heteróloga se expresa en un tejido de hoja, cáscara, tallo o barba. En otras modalidades, el

polinucleótido comprende una secuencia de polinucleótidos de nucleótidos 1-1,887 de la SEQ ID NO:2.

En una modalidad, la descripción se refiere a un método para aislar una secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2, el método comprende:

- a) identificar la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2;
- b) producir una pluralidad de secuencias de cebadores de oligonucleótidos, donde las secuencias de cebadores de oligonucleótidos se unen a la secuencia de polinucleótidos que comprenden una identidad de secuencia de al menos 90% con respecto a la SEQ ID NO:2;
- c) amplificar la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con respecto a la SEQ ID NO:2 a partir de una muestra de ADN con las secuencias de cebadores de oligonucleótidos seleccionadas de la pluralidad de secuencias de cebadores de oligonucleótidos; y,

- d) aislar la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2.

En modalidades adicionales, la secuencia de polinucleótidos comprende un intrón. En otras modalidades, el intrón tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la SEQ ID NO:5. En una modalidad, la secuencia de polinucleótidos tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:1. En una modalidad adicional, la secuencia de polinucleótidos aislada que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2 está unida de manera operativa a un transgén. En una modalidad adicional, el transgén unido de manera operativa codifica un polipéptido. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende una secuencia de polinucleótidos con una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2 unida de manera operativa a un transgén, donde el transgén está unido de manera operativa a una región 3'- no traducida. En una modalidad, la región 3' no traducida comprende un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8. En una modalidad adicional, el

transgén se selecciona del grupo que consiste en secuencias codificantes de resistencia insecticida, secuencias codificantes de tolerancia herbicida, secuencias codificantes de eficiencia en el uso de nitrógeno, secuencias codificantes de eficiencia del uso de agua, secuencias codificantes de calidad nutricional, secuencias codificantes de unión a ADN, y secuencias codificantes de marcador seleccionable. En una modalidad, un vector recombinante comprende un casete de expresión génica. En una modalidad adicional, el vector se selecciona del grupo que consiste en un vector de plásmido, un vector de cósmido y un vector de BAC. En una modalidad, una célula transgénica comprende el casete de expresión génica. En una modalidad adicional, la célula transgénica es una célula vegetal transgénica. En una modalidad, una planta transgénica comprende una célula vegetal transgénica. En una modalidad adicional, la planta transgénica es una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea. En una modalidad adicional, la planta monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una planta de maíz, una planta de trigo y una planta de arroz. En una modalidad, una semilla transgénica se obtiene a partir de una planta transgénica. En otras modalidades, el polinucleótido aislado comprende una

secuencia de polinucleótidos de los nucleótidos 1-1,887 de la SEQ ID NO:2.

En una modalidad, la descripción se refiere a un método para producir una secuencia de polinucleótidos sintéticos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2, el método comprende:

- a) identificar la secuencia de polinucleótidos que comprende la SEQ ID NO:2;
- b) aislar la secuencia de polinucleótidos que comprende la SEQ ID NO:2;
- c) definir una pluralidad de secuencias de polinucleótidos que comprenden una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2.
- d) sintetizar una secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2 y,
- e) producir una secuencia de polinucleótidos sintéticos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2.

En una modalidad adicional, la síntesis comprende:

- a) identificar la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2;
- b) producir una pluralidad de secuencias de cebadores de oligonucleótidos, donde las secuencias de cebadores de oligonucleótidos se unen a la secuencia de polinucleótidos que comprenden una identidad de secuencia de al menos 90% con respecto a la SEQ ID NO:2;
- c) ligar la pluralidad de secuencias de cebadores de oligonucleótidos para sintetizar la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con respecto a la SEQ ID NO:2.

En modalidades adicionales, la secuencia de polinucleótidos sintetizados comprende un intrón. En otras modalidades, el intrón tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con la SEQ ID NO:5. En una modalidad, la secuencia de polinucleótidos sintetizada tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:1. En una modalidad adicional, la secuencia de polinucleótidos sintetizada comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:2 que está unida de manera

operativa a un transgén. En aun otra modalidad, el transgén unido de manera operativa codifica un polipéptido. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende la secuencia de polinucleótidos sintetizada que comprende una identidad de secuencia de al menos 90 % con la SEQ ID NO:2 unida de manera operativa con el transgén que está unido operativamente a la región 3' no traducida. En una modalidad, la región 3' no traducida comprende un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con respecto a la SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8. En aun otra modalidad, el transgén se selecciona del grupo que consiste en un transgén de resistencia insecticida, transgén de tolerancia herbicida, transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, transgén de eficiencia del uso de agua, transgén de calidad nutricional, transgén de unión a ADN, y transgén de marcador seleccionable. En una modalidad, un vector recombinante comprende el casete de expresión génica. En una modalidad adicional el vector recombinante se selecciona del grupo que consiste en un vector de plásmido, un vector de cósmido y un vector de BAC. En una modalidad, una célula transgénica comprende el casete de expresión génica. En una modalidad adicional, la célula transgénica es una célula

vegetal transgénica. En una modalidad, una planta transgénica comprende una célula vegetal transgénica. En una modalidad adicional, la planta transgénica es una planta monocotiledónea. En otras modalidades, la planta monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una planta de maíz, una planta de trigo y una planta de arroz. En una modalidad, una semilla transgénica se obtiene a partir de una planta transgénica. En otras modalidades, el polinucleótido sintético comprende una secuencia de polinucleótidos de los nucleótidos 1-1.887 de la SEQ ID NO:2.

En una modalidad, una construcción comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO:4. En una modalidad, un casete de expresión génica incluye un promotor del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO:4 unido de manera operativa a un transgén o a una secuencia codificante heteróloga. En una modalidad, un casete de expresión génica incluye una 3' -UTR del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO:7, o SEQ ID NO:8 unida de manera operativa a un transgén. En una modalidad, un casete de expresión génica incluye una 3' -UTR

del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO:7, o SEQ ID NO:8 unida de manera operativa a un promotor. En una modalidad adicional, un casete de expresión génica incluye una 3' -UTR del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO:7, o SEQ ID NO:8 unida de manera operativa a un promotor del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO:4. En una modalidad, un casete de expresión génica incluye una 5' -UTR del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO:19 unida de manera operativa a un transgén. En una modalidad, un casete de expresión génica incluye una 5' -UTR del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO:7 unida de manera operativa a un promotor. En una modalidad adicional, un casete de expresión génica incluye una 5' -UTR del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO:7 unida de manera operativa a un promotor del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO:4. En una modalidad, un casete de expresión génica incluye un intrón del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO:5, o SEQ ID NO:6 unido de manera operativa a un transgén. En una modalidad, un casete de expresión génica incluye un

intrón del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID N0:5, o SEQ ID N0:6 unido de manera operativa a un promotor. En una modalidad, un casete de expresión génica incluye un promotor del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID N0:1, SEQ ID N0:2, SEQ ID N0:3, o SEQ ID N0:4 unido de manera operativa 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 una modalidad, un casete de expresión génica incluye de manera independiente a) un promotor del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID N0:1, SEQ ID N0:2, SEQ ID N0:3, o SEQ ID N0:4, b) un intrón del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID N0:5 o SEQ ID N0:6, c) y una 3'-UTR del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID N0:7 o SEQ ID N0:8 y d) una 5'-UTR del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID N0:19.

En la presente se describen métodos de cultivo de plantas que expresan un transgén usando promotores del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID N0:1, SEQ ID N0:2, SEQ ID N0:3, o SEQ ID N0:4; intrones de la SEQ ID N0:5 o SEQ ID N0:6; 3'-UTR de la SEQ ID N0:7 o SEQ ID N0:8; y 5'-UTR de

la SEQ ID N0:19. En la presente también se describen métodos de cultivo de células y tejidos vegetales que expresan un transgén usando los promotores del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID N0:1, SEQ ID N0:2, SEQ ID N0:3, o SEQ ID N0:4; intrones de la SEQ ID N0:5 o SEQ ID N0:6; 3'-UTR de la SEQ ID N0:7 o SEQ ID N0:8; y 5'-UTR de la SEQ ID N0:19. En una modalidad, los métodos como se describen en la presente incluyen la expresión génica específica de tejido en hojas y tallos vegetales.

En una modalidad, un casete de expresión génica incluye una secuencia de polinucleótidos promotora de la SEQ ID N0:1, SEQ ID N0:2, SEQ ID N0:3, o SEQ ID N0:4 que se obtuvo a partir del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

LA FIG. 1 es un diagrama de flujo esquemático que muestra el proceso de identificación de genes de expresión alta en el maíz usando un enfoque de perfil transcripcional con la Secuenciación de Última Generación (NGS, por sus siglas en inglés).

LA FIG. 2 muestra un alineamiento de la longitud completa del promotor del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays*

(SEQ ID NO:1) en comparación con el promotor del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* modificado (SEQ ID NO:3), este alineamiento muestra las secuencias de polinucleótidos repetidas que fueron quitados para producir la secuencia del promotor del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* modificado.

LA FIG. 3 muestra el mapa de plásmidos del vector pDAB114438 que ilustra un casete de expresión génica que comprende los elementos reguladores del promotor del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa (marcado como "promotor ZmCAB") que controla la expresión de un gen indicador *cry34Ab1*.

LA FIG. 4 muestra un mapa del vector de control pDAB101556 que contiene un gen indicador *yfp* en lugar del gen indicador *cry34Ab1* presente en la construcción promotora de prueba, pDAB114438, como el gen de interés. La expresión génica de *yfp* fue impulsada por el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays* (ZmUbi1) y terminada por la 3'-UTR de *Zea mays* Per5 (ZmPer5).

LA FIG. 5 muestra un mapa de pDAB108746, un vector de control positivo que contiene el gen indicador *cry34Ab1*

impulsado por el promotor de *ZmUbi1* y terminado por la 3'-UTR de *Solanum tuberosum* PinII (StPinII).

LA FIG. 6 muestra el mapa de plásmidos del vector pDAB120165 que ilustra un casete de expresión génica que comprende los elementos reguladores del promotor del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* modificado que controlan la exposición de un gen indicador *cry34Ab1*.

LA FIG. 7 muestra el mapa de plásmidos del vector pDAB120166 que ilustra un casete de expresión génica que comprende el promotor del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa (marcado como "promotor ZmCAB") y los elementos reguladores de la 3' UTR del gen de unión de la clorofila a/b de *Zea mays* modificada (SEQ ID No. 8) que controlan la expresión del gen indicador *cry34Ab1*.

MODO/S PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Definiciones

Tal como se usa en la presente, los artículos "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto claramente 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 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 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 de *Arabidopsis thaliana* o cualquier otra secuencia de intrones comúnmente conocida. Los intrones se pueden 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 ARNm maduros, una 5'-UTR típicamente posee en su extremo 5' un casquete de 7-metilguanosina y participa en muchos procesos tales como empalme, poliadenilación, exportación del ARNm hacia el citoplasma, identificación del extremo 5' del ARNm mediante la maquinaria de traducción y protección de los ARNm contra la degradación.

Tal como se usa en la presente, el término “región 3' no traducida” o “3'-UTR” se refiere a un 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 al.*, (2005) *Plant Physiology* 138(3); 1457-1468.

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

Tal como se usa en la presente, el término "purificado" en referencia a las moléculas de ácido nucleico no requiere pureza absoluta (tal como una preparación homogénea); por el contrario, representa una indicación de que la secuencia es relativamente más pura que en su entorno celular natural (en comparación con el nivel natural, este nivel debería ser al menos 2-5 veces mayor, por ejemplo, en términos de niveles de expresión génica o concentración). Las moléculas de ADN se pueden obtener directamente del ADN total o del ARN total. Además, los clones de ADNc que no son de origen natural, pero que son preferentemente obtenidos de la manipulación de una sustancia de origen natural parcialmente purificada (ARN

mensajero). La construcción de una biblioteca de ADNc a partir de ARNm implica la creación de una sustancia 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 podría clonar en un plásmido. Dicho clon no es de origen natural, pero se obtiene preferiblemente 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, y en algunas modalidades dos o tres órdenes, y en otras modalidades cuatro o cinco o más 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 moléculas de ácido nucleico

purificadas mediante métodos de purificación estándar. El término "purificado" también comprende ácidos nucleicos y proteínas preparadas mediante métodos de ADN recombinante en una célula huésped (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 incluye una molécula (por ejemplo, un vector, plásmido, ácido nucleico, polipéptido o ARN pequeño) que ha sido alterado artificial 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 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 transcrito (también llamado "transcripción") 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 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 al 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 (silenciamiento génico transcripcional; TGS, por sus siglas en inglés) o la

degradación del ARNm (silenciamiento génico postranscripcional; PTGS, por sus siglas en inglés), debido a la producción de ARN de doble cadena (ARNdc) 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 ARNdc 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 ARNdc 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 10 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 entre sí por medio de enlaces de nucleótidos de origen natural y/o de origen no natural.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden modificar química o bioquímicamente, o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizados, como lo entenderá fácilmente un experto en la técnica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, substitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones entre nucleótidos (por ejemplo, enlaces no cargados: por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.; enlaces cargados: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.; restos colgantes: por ejemplo, péptidos; intercaladores: por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.; quelantes; alquilantes; y enlaces modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos,

etc.). El término "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier conformación topológica, incluyendo conformaciones monocatenarias, bicatenarias, parcialmente en dúplex, en tríplex, en forma de horquilla, circulares y en 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 particulares) se pueden definir como que están "anteriores" con respecto a un elemento adicional si están o estuviesen unidos al mismo ácido nucleico en la dirección 5' desde ese elemento. De manera similar, los distintos elementos pueden estar "posteriores" con respecto a un elemento adicional si están o estuviesen unidos al mismo ácido nucleico en la dirección 3' desde 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 polinucleótidos u 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 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 se unirá mediante enlace de hidrógeno a T o U, y G se unirá a C. "Complementario" se refiere al apareamiento de bases que ocurre entre dos secuencias de ácido nucleico distintas o dos regiones distintas de la misma secuencia de ácido nucleico.

Tal como se usa en la presente, los términos "específicamente hibridable" y "específicamente complementario" se refiere a un grado suficiente de complementariedad de modo que ocurre la unión estable y específica entre un polinucleótido/oligonucleótido y el DNA o ARN objetivo. Los oligonucleótidos/polynucleótidos no tienen

que ser necesariamente 100 % complementarios a la secuencia objetivo para hibridarse específicamente. Un oligonucleótido/polinucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido/polinucleótido 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/polinucleótido 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 unión se denomina hibridación específica. Las condiciones de hibridación que dan como resultado grados particulares de rigurosidad variarán en función de la naturaleza del método de hibridación elegido y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico de que se hibridan. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente concentración de Na^+ y/o Mg^{2+}) de un amortiguador de hibridación contribuirá a la rigurosidad de hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen en la rigurosidad. Los cálculos con respecto a las condiciones de hibridación necesarias para lograr grados de rigurosidad particulares se discuten en Sambrook *et al.* (ed.), Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, 2da. ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.

Tal como se usa en la presente, el término "condiciones de rigurosidad" comprende las condiciones en las que la hibridación solo ocurrirá si hay menos de 50 % de mal apareamiento entre la molécula de hibridación y el ADN objetivo. "Condiciones de rigurosidad" incluyen niveles adicionales de rigurosidad en particular. Por lo tanto, tal como se usa en la presente, las condiciones de "rigurosidad moderada" son aquellas en las que las moléculas con más de 50 % de mal apareamiento de secuencia no se hibridarán; las condiciones de "rigurosidad alta" son aquellas en las que las secuencias con más de 20 % de mal apareamiento no se hibridarán; y las condiciones de "rigurosidad muy alta" son aquellas en las que las secuencias con más de 10 % de mal apareamiento no se hibridarán.

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

- Rigurosidad Muy Alta: hibridación en amortiguador SSC 5x a 65 °C durante 16 horas; lavar dos veces en amortiguador SSC 2x a temperatura ambiente durante 15 minutos cada uno; y lavar dos veces en amortiguador SSC 0,5x SSC a 65 °C durante 20 minutos cada uno.
- Rigurosidad Alta: hibridación en amortiguador SSC 5-6 x a 65-70 °C durante 16-20 horas; lavar dos veces en amortiguador SSC 2x 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 tiene que estar disponible, de modo que puedan diseñarse cebadores de oligonucleótidos; estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a cadenas opuestas de la plantilla que se amplificará. 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 específicas de ADN genómico total, y ADNc transcrito de ARN celular total, secuencias de bacteriófagos o plásmidos, etc. Véase generalmente Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263 (1987); Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989).

Tal como se usa en la presente, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como 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

trifosfatos deoxirribonucleótidos diferentes y al menos un agente de inducción de la polimerización tal como una transcriptasa inversa o ADN polimerasa. Estos están presentes en un amortiguador adecuado, que puede incluir constituyentes que son cofactores o que afectan condiciones tales como el pH y similares en 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 se 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 desde alrededor de ocho nucleótidos hasta 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. En tal ensayo, 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 desde alrededor de 500 nucleótidos hasta alrededor de 2500 nucleótidos.

Una sonda puede también incluir una etiqueta detectable, por ejemplo, una etiqueta radioactiva, una etiqueta biotinilada, un fluoróforo (TEXAS-RED®, isotiocianato de fluoresceína, etc.). La etiqueta detectable puede estar unida de forma covalente directamente al oligonucleótido de sonda, por ejemplo, ubicado en el extremo 5' de la sonda o en el extremo 3' de la sonda. Una sonda que incluye un fluoróforo también puede incluir adicionalmente un desactivador, por ejemplo, BLACK HOLE QUENCHER™, IOWA BLACK™, etc.

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

máxima correspondencia en una ventana de comparación especificada.

Tal como se usa en la presente, el término “porcentaje de identidad de secuencia” se refiere a un valor determinado al comparar dos secuencias alineadas de forma óptima (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos) en una ventana de comparación, donde la parte de una secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) comparado con una secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. Un porcentaje se calcula al determinar el número de posiciones en las que un residuo de ácido nucleico o de aminoácido idénticos se presenta en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones emparejadas, dividir el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicar el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Se conocen los métodos para alinear secuencias para su comparación. Varios programas y algoritmos de alineamiento se describen en, por ejemplo: Smith 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. EUA.* 85:2444; Higgins y Sharp (1988) *Gene* 73:237-44; Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-3; Corpet *et al.*, (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang *et al.*, (1992) *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 al.*, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10) se encuentra disponible de varias fuentes, incluyendo el Centro 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 está disponible una descripción sobre cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa. Para comparaciones de secuencias de ácido nucleico, se puede usar la función "secuencias Blast 2" del programa BLAST™ (Blastn) utilizando los parámetros predeterminados. Las secuencias de ácido nucleico con similitud aun mayor con respecto a las secuencias de

referencia mostrarán crecientes porcentajes de identidad cuando se analise 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 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.

Tal como se usa en la presente, el término "promotor" se refiere a una región de ADN que generalmente está ubicada en la parte anterior (hacia la región 5' de un gen) de un gen y es necesario para iniciar e impulsar la transcripción del gen. Un promotor puede permitir la activación o la represión adecuada de un gen que este 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 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 promotores anteriores, 5'-UTR, intrones y secuencias líderes.

Tal como se usa en la presente, el término "promotor anterior" se refiere a una secuencia de polinucleótidos contigua que es suficiente para dirigir el inicio de la transcripción. Tal como se usa en la presente, un promotor anterior comprende el sitio de inicio de la transcripción con varios motivos de secuencias, que incluye una caja TATA, una secuencia iniciadora, elementos de reconocimiento de TFIIB 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, que es 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 inicio previo de la transcripción que cataliza la síntesis de ARN a partir de una plantilla de ADN.

La activación del promotor anterior se realiza mediante la secuencia adicional de los elementos de la secuencia

reguladora de ADN, a las cuales se unen varias proteínas y posteriormente interactúan con el complejo de inicio de la transcripción para activar la expresión génica. Estas secuencias de elementos reguladores de genes interactúan con factores de unión a ADN específicos. Estos motivos de secuencias a veces se pueden llamar elementos *cis*. Tales elementos *cis*, a los que se unen los factores de transcripción específicos del desarrollo o específicos del tejido, individualmente o en combinación, pueden determinar el patrón de expresión espaciotemporal de un promotor en el nivel transcripcional. Estos elementos *cis* varían ampliamente en el tipo de control que ejercen en los genes unidos de manera operativa. Algunos elementos actúan para aumentar la transcripción de genes unidos de manera operativa en respuesta a respuestas ambientales (por ejemplo, temperatura, humedad y lesión). Otros elementos *cis* pueden responder a las señales del desarrollo (por ejemplo, germinación, maduración de la semilla y florecimiento) o a la información espacial (por ejemplo, la especificidad del tejido). Véase, por ejemplo, Langridge *et al.*, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86:3219-23. Estos elementos *cis* se ubican a una distancia variable del punto de inicio de la transcripción, algunos

elementos cis (llamados elementos próximos) son adyacentes a una región promotora nuclear mínima, mientras que otros elementos se pueden ubicar a varias kilobases hacia la parte anterior o posterior del promotor (potenciadores).

Un "transgén de unión a ADN" es una secuencia codificante de polinucleótidos que codifica una proteína de unión a ADN. La proteína de unión a ADN posteriormente es capaz de unirse a otra molécula. Una proteína de unión puede unirse a, por ejemplo, una molécula de ADN (una proteína de unión a ADN), una molécula de ARN (una proteína de unión a RNA) y/o una molécula de proteína (una proteína de unión a proteína). En el caso de una proteína de unión a proteína, se puede unir a sí misma (para formar homodímeros, homotrímeros, etc.) y/o puede unirse a una o más moléculas de una proteína o proteínas diferentes. Una proteína de unión puede tener más de un tipo de actividad de unión. Por ejemplo, las proteínas con dedos de zinc poseen actividad de unión a ADN, de unión a ARN y de unión a proteína.

Los ejemplos de proteínas de unión a ADN incluyen; dominios de unión a TALE, meganucleasas, dedos de zinc, y CRISPR, que pueden "modificarse genéticamente" para unirse a una secuencia de polinucleótidos determinada. Típicamente,

las proteínas de unión al ADN genéticamente modificadas (por ejemplo, dedos de zinc CRISPR o TALE) son proteínas de origen no natural. El diseño y la selección son ejemplos no taxativos de métodos para modificar genéticamente las proteínas de unión a ADN. Una proteína de unión a ADN diseñada es una proteína de origen no natural cuyo diseño/composición se obtiene como resultado principalmente de criterios racionales. Los criterios racionales para el diseño incluyen la aplicación de reglas de sustitución y algoritmos computarizados para procesar la información en una base de datos que almacena información sobre diseños de ZFP, CRISPR y/o TALE existentes y datos de unión. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,140,081; 6,453,242; y 6,534,261; ver también WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496 y las publicaciones estadounidenses n.º 20110301073, 20110239315 y 20119145940.

Una "proteína de unión a ADN de dedos de zinc" (o dominio de unión) es una proteína o un dominio dentro de una proteína más grande que se une a ADN de una forma específica de la secuencia a través de uno o más dedos de zinc, que son regiones de secuencia de aminoácidos dentro del dominio de unión cuya estructura se estabiliza mediante la coordinación

de un ion de zinc. La expresión proteína de unión a ADN de dedos de zinc se abrevia a menudo como proteína de dedos de zinc o ZFP. Los dominios de unión de dedos de zinc se pueden "modificar genéticamente" para unirse a una secuencia de nucleótidos predeterminada. El diseño y la selección son ejemplos no taxativos de métodos para modificar genéticamente las proteínas de dedos de zinc. Una proteína de dedos de zinc diseñada es una proteína de origen no natural cuyo diseño/composición se obtiene principalmente como resultado de criterios racionales. Los criterios racionales para el diseño incluyen la aplicación de reglas de sustitución y algoritmos informáticos para procesar información en una base de datos que almacena información de datos de unión y diseños de ZFP existentes. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 6,140,081; 6,453,242; 6,534,261 y 6,794,136; ver también WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496.

En otros ejemplos, el dominio de unión a ADN de una o más de las nucleasa comprende un dominio de unión al ADN efector de TAL de origen natural o modificado genéticamente (de origen no natural). Ver, por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 20110301073. Las bacterias

patógenas vegetales del género *Xanthomonas* son conocidas por causar muchas enfermedades en plantas de cultivo importantes. La patogenicidad de *Xanthomonas* depende de un sistema de secreción de tipo III conservado (T3S) que inyecta más que diferentes proteínas efectoras en la célula vegetal. Entre estas proteínas inyectadas están los efectores similares a los activadores de transcripción (TALEN) que imitan a los activadores de la transcripción vegetal y manipulan el transcriptoma vegetal (ver Kay *et al.*, (2007) *Science* 318:648-651). Estas proteínas contienen un dominio de unión a ADN y un dominio de activación de la transcripción. Uno de los efectores TAL mejor caracterizados es AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (ver Bonas *et al.*, (1989) *Mol Gen Genet* 218: 127-136 y W02010079430). Los efectores TAL contienen un dominio centralizado de repeticiones en tándem, cada repetición contiene aproximadamente 34 aminoácidos, que son clave para la especificidad de unión a ADN de estas proteínas. Adicionalmente, contienen una secuencia de ubicación nuclear y un dominio de activación de la transcripción ácida (por una revisión ver Schornack S, *et al.*, (2006) *J Plant Physiol* 163(3): 256-272). Además, se descubrió que en la bacteria

fitopatogénica *Ralstonia solanacearum* dos genes, denominados *brg11* y *hpx17* son homólogos a la familia AvrBs3 de *Xanthomonas* en la cadena biovar GMI1000 de *R. solanacearum* y en la cadena biovar 4 RS1000 (Ver Heuer *et al.*, (2007) *Appl and Enviro Micro* 73(13): 4379-4384). Estos genes son 98,9 % idénticos en la secuencia de polinucleótidos a los otros pero difieren mediante una eliminación de 1.575 pb en el dominio de repetición de *hpx17*. Sin embargo, ambos productos génicos tienen una identidad de secuencia menor a 40 % con respecto a las proteínas de la familia AvrBs3 de *Xanthomonas*. Véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.º 20110301073.

La especificidad de estos efectores TAL depende de las secuencias encontradas en las repeticiones en tándem. La secuencia repetida comprende aproximadamente 102 pb y las repeticiones son típicamente 91-100 % homólogas con respecto a cada una de las otras (Bonas *et al.*, *ibid*). El polimorfismo de las repeticiones se ubica usualmente en las posiciones 12 y 13 y parece haber una correspondencia uno a uno entre la identidad de los diresiduos variables en las posiciones 12 y 13 con la identidad de los nucleótidos contiguos en la secuencia objetivo del efector TAL (ver Moscou y Bogdanove,

(2009) *Science* 326:1501 y Boch *et al.*, (2009) *Science* 326:1509-1512). De manera experimental, el código natural para el reconocimiento de ADN de estos efectores TAL ha sido determinado de modo tal que una secuencia HD en las posiciones 12 y 13 lleve a una unión a citocina (C), NG se une a T, NI a A, C, G o T, NN se une a A o G, e ING se une a T. Estas repeticiones de unión a ADN se han ensamblado en proteínas con nuevas combinaciones y números de repeticiones, para realizar los factores de transcripción artificial que son capaces de interactuar con secuencias nuevas y activar la expresión de un gen indicador no endógeno en células vegetales (Boch *et al.*, *ibid*). Las proteínas TAL modificadas genéticamente se han unido a semidominio de escisión FokI para producir una fusión de nucleasas con dominio efector TAL (TALEN) que exhibe actividad en un ensayo indicador de levadura (objetivo basado en plásmido).

El sistema de nucleasa CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas espaciadas y regularmente agrupadas)/Cas (asociado a CRISPR) es un sistema de nucleasas recientemente modificado genéticamente basado en un sistema bacteriano que puede utilizarse para la modificación genética del genoma. Se basa en parte de la respuesta inmune adaptable de muchas

bacterias y arqueas. Cuando un virus o plásmido invade una bacteria, la respuesta "inmune" convierte segmentos del ADN del invasor en los ARN CRISP (ARNcr). Este ARNcr se asocia entonces, a través de una región de complementariedad parcial, con otro tipo de ARN llamado ARNtracr para guiar a la nucleasa Cas9 a una región homóloga al ARNcr en el ADN objetivo llamada "protoespaciadora". Cas9 escinde el ADN para generar extremos romos en la rotura de doble cadena (DSB por sus siglas en inglés) en sitios especificados mediante una secuencia guía de 20 nucleótidos contenida dentro de la transcripción de ARNcr. Cas9 requiere tanto de ARNcr como de ARNtracr para el reconocimiento y la escisión del ADN específico del sitio. Este sistema ahora ha sido modificado genéticamente de modo tal que el ARNcr y ARNtracr pueden combinarse en una molécula (el "ARN guía único") y la porción equivalente de ARNcr del ARN guía único puede modificarse genéticamente para guiar a la nucleasa Cas9 a dirigir cualquier secuencia deseada (ver Jinek *et al.* (2012) *Science* 337, p. 816-821, Jinek *et al.*, (2013), *eLife* 2:e00471, y David Segal, (2013) *eLife* 2:e00563). Por lo tanto, el sistema CRISPR/Cas puede modificarse genéticamente para crear una DSB en un objetivo deseado en un genoma y la reparación del DSB

puede influenciarse mediante el uso de inhibidores de la reparación que causan un aumento en la reparación propensa al error.

En otros ejemplos, el transgén de unión a ADN es una nucleasa específica para el sitio que comprende una Meganucleasa modificada genéticamente (de origen no natural) (también descrita como una endonucleasa homing). Se conocen las secuencias de reconocimiento de meganucleasas o endonucleasas homing tales como I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII and I-TevIII. Ver también patente estadounidense n.º 5.420.032; patente estadounidense n.º 6.833.252; Belfort *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-30 3388; Dujon *et al.*, (1989) *Gene* 82:115-118; Perler *et al.*, (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 11127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble *et al.*, (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast *et al.*, (1998) *J. Mol. Biol.* 280: 345-353 y el catálogo de New England Biolabs. Además, la especificidad de unión al ADN de las meganucleasas y endonucleasas homing puede modificarse genéticamente para unir sitios objetivo no naturales. Ver, por ejemplo, Chevalier *et al.*, (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat *et*

al., (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth *et al.*, (2006) *Nature* 441:656-659; Paques *et al.*, (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; la publicación de patente estadounidense n.º 20070117128. Los dominios de unión al ADN de las meganucleasas y endonucleasas homing pueden alterarse en el contexto de la nucleasa como un todo (es decir, de modo que la nucleasa incluya el dominio de escisión cognado) o pueden fusionarse con un dominio de escisión heterólogo.

Tal como se usa en la presente, el término "transformación" abarca todas las técnicas por las cuales se puede introducir una molécula de ácido nucleico en dicha célula. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo: transfección con vectores virales; transformación con vectores de plásmidos; electroporación; lipofección; microinyección (Mueller *et al.*, (1978) *Cell* 15:579-85); transferencia mediada por *Agrobacterium*; absorción directa del ADN; transformación mediada por WHISKERS™; y bombardeo de microproyectiles. Estas técnicas se pueden usar para la transformación estable y para la transformación transitoria de una célula vegetal.

"Transformación estable" se refiere a la introducción de un fragmento de ácido nucleico en un genoma de un organismo huésped lo que resulta en una herencia estable genéticamente.

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

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 de tolerancia 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 un ARN pequeño, tal como una secuencia de ácido nucleico antisentido, donde la expresión de la secuencia de ARN pequeño inhibe la 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 o 3'-UTR). En algunas modalidades, un ácido nucleico de interés es un transgén. Sin embargo, en otras modalidades, un ácido nucleico de interés es un ácido nucleico endógeno, donde se 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 huésped.

Tal como se usa en la presente, el término "ARN pequeño" se refiere a varias clases de ácido ribonucleico no codificante (ARNnc). El término ARN pequeño describe las cadenas cortas de ARNnc producidas en células bacterianas, animales, plantas y hongos. Estas cadenas cortas de ARNnc pueden producirse de manera natural dentro de la célula o pueden producirse por la introducción de una secuencia endógena que expresa la cadena corta o ARNcr. Las secuencias de ARN pequeño no codifican directamente para una proteína, y difieren en función de otros ARN en que las secuencias de ARN pequeño sólo se transcriben y no se traducen. Las secuencias de ARN pequeño están implicadas en otras funciones celulares, incluidas la expresión génica y la modificación. Las

moléculas de ARN pequeño se componen generalmente de alrededor de 20 a 30 nucleótidos. Las secuencias de ARN pequeño pueden derivarse a partir de precursores más largos. Los precursores forman estructuras que se doblan sobre sí en regiones de autocomplemento; que son entonces procesadas por la nucleasa Dicer en animales o DCL1 en las plantas.

Existen muchos tipos de ARN pequeño producidos de forma natural o artificial, incluyendo ARNmicro (ARNmi), ARN de interferencia corta (ARNic), ARN antisentido, ARN de horquilla corta (ARNhc), y ARN nucleolares pequeños (ARNnp). Ciertos tipos de ARN pequeño, como ARNmicro y ARNsi, son importantes en el silenciamiento de genes y ARN de interferencia (ARNi). El silenciamiento génico es un proceso de regulación genética en el que un gen que normalmente se expresaría se "apaga" mediante un elemento intracelular, en este caso, el ARN pequeño. La proteína que normalmente se formaría por esta información genética no se forma debido a la interferencia, y la información codificada en el gen está bloqueada desde la expresión.

Tal como se usa en la presente, el término "ARN pequeño" comprende moléculas de ARN descritas en la literatura como "ARN diminutos" (Storz, (2002) *Science* 296:1260-3;

Illangasekare *et al.*, (1999) *RNA* 5:1482-1489); "ARN pequeño de procariotas (ARNs) (Wassarman *et al.*, (1999) *Trends Microbiol.* 7:37-45); "ARN no codificante (ARNnc)" eucariota; "microARN (miARN)"; "ARNm no pequeño (ARNsnm)", "ARN funcional (ARNf)," "ARN de transferencia (ARNt)", "ARN catalítico" [por ejemplo, ribosomas, incluidos los ribosomas que se autoacilan (Illangaskare *et al.*, (1999) *RNA* 5:1482-1489); "ARN nucleolares pequeños (RNAnp)", "ARNtm" (también conocido como "10S ARN", Muto *et al.*, (1998) *Trends Biochem Sci.* 23:25-29; y Gillet *et al.*, (2001) *Mol Microbiol.* 42:879-885); moléculas de ARNi incluidos de modo no taxativo "ARN de interferencia pequeña (ARNip)," "ARNip preparado con endorribonucleasa (ARNip-e), "ARN de horquilla corta (ARNhc)" y "ARN pequeño temporalmente regulado (ARNtp)," "diced siRNA (d-siRNA)," y aptámeros, oligonucleotidos y otros ácidos nucleicos que comprenden al menos una base de uracil.

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 huésped, 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 y/o 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 incluir opcionalmente materiales para ayudar a lograr la entrada de la molécula de ácido nucleico en la célula (por ejemplo, un liposoma).

Tal como se usan en la presente, las expresiones "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 huésped 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 huésped. Estos elementos pueden incluir, de modo no taxativo: un promotor, un promotor mínimo, un potenciador, un elemento de respuesta, un intrón, una secuencia de región no traducida 5', una secuencia de región no traducida 3', 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 normalmente en el organismo huésped y que se puede expresar en la célula huésped bajo 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 huésped, de manera que la célula expresa copias adicionales de una secuencia codificante que no están presentes normalmente en las células. Las secuencias codificantes heterólogas pueden ser ARN o cualquier tipo de este, por ejemplo, ARNm, ADN o cualquier tipo de este por ejemplo, ADNc, o un híbrido de ARN/ADN. Los ejemplos de secuencias codificantes incluyen, de modo no taxativo, unidades de transcripción de longitud completa que comprenden características como las de la secuencia codificante, intrones, regiones promotoras, 5'-UTR, 3'-UTR y regiones potenciadoras.

"Secuencias codificantes heterólogas" también incluye la parte codificante del péptido o enzima, es decir, la secuencia de ARNm o ADNc del péptido o enzima, así como también la parte codificante de la unidad de transcripción de longitud completa, es decir, el gen que comprende intrones y exones, secuencias de "codones optimizados", secuencias truncadas u otras formas de secuencias alteradas que codifican la enzima o codifican su secuencia de aminoácido equivalente, siempre que la secuencia de aminoácidos equivalente produzca una proteína funcional. Dichas secuencias de aminoácidos equivalentes pueden tener una

eliminación de uno o más aminoácidos, donde la eliminación es de extremo N, extremo C o interna. Las formas truncadas se conciben siempre que tengan la capacidad catalítica indicada en la presente.

Como se usa en la presente, el término "control" se refiere a una muestra utilizada en un procedimiento analítico con fines comparativos. Un control puede ser "positivo" o "negativo". Por ejemplo, si el propósito de un 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 la expresión deseada, y un control negativo, tal como una muestra de una planta conocida que no presenta la expresión deseada.

Tal como se usa en la presente, el término "planta" incluye plantas y partes de plantas, inclusive, de modo no taxativo células vegetales y tejidos vegetales, tales como hojas, 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 inclusive 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, berenjena 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, la expresión "material vegetal" se refiere a hojas, 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, la expresión "gen marcador seleccionable" se refiere a un gen que se usa

opcionalmente en la transformación vegetal para, por ejemplo, proteger células vegetales de un agente selectivo o proporcionar resistencia/tolerancia a un agente selectivo. Además, "gen marcador seleccionable" pretende comprender genes indicadores. Solo aquellas células o plantas que reciben un marcador seleccionable funcional son capaces de dividirse o crecer en condiciones que tienen 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 (npt II), que expresa una enzima que confiere resistencia al antibiótico kanamicina y genes para los antibióticos relacionados neomicina, paromomicina, gentamicina y G418, o el gen para higromicina fosfotransferasa (hpt), que expresa una enzima que confiere resistencia a higromicina. Otros genes marcadores seleccionables pueden incluir genes que codifican la tolerancia a herbicidas inclusive *bar* o *pat* (tolerancia contra glufosinato de amonio o fosfinotricina), acetolactato sintasa (ALS, tolerancia contra inhibidores tales como sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas

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

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

ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), 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 brazos 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 al.*,

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

Elementos reguladores

Los promotores vegetales utilizados para las aplicaciones biotecnológicas o de investigación básicas dirigen la expresión del transgén que se ha fusionado en su extremo 3' (posterior) para expresar fuertemente los transgenes dentro de las plantas para la modificación genética metabólica y el apilamiento de rasgos. Como resultado, existe una necesidad de promotores novedosos que puedan conducir la expresión de múltiples genes en los cultivos transgénicos. En la presente se describe un promotor que puede dirigir la expresión de un primer gen que ha sido fusionado en su extremo 3' (posterior).

El desarrollo de los productos transgénicos se está volviendo muy complejo, lo que requiere que se expresen transgenes de manera fuerte y que se apilen múltiples transgenes en un solo locus. Tradicionalmente, cada transgén necesita un promotor único para la expresión donde se necesitan múltiples promotores para expresar transgenes

diferentes dentro de una pila de genes. Con un tamaño en aumento de las pilas de genes, esto frecuentemente conlleva al uso repetido del mismo promotor para obtener niveles similares de patrones de expresión de diferentes transgenes para la expresión de un único rasgo poligénico. Se sabe que las construcciones génicas múltiples conducidas por el mismo promotor causan el silenciamiento de genes lo que resulta en productos transgénicos menos eficaces en el campo. El exceso de sitios de unión a factores de transcripción (TF, por sus siglas en inglés), debido a la repetición de promotores, puede causar la disminución de TF endógeno, lo que lleva a la inactivación transcripcional. El silenciamiento de los transgenes probablemente afectará de forma no deseada el rendimiento de una planta transgénica producida para expresar transgenes. Las secuencias repetitivas dentro de un transgén pueden llevar a la recombinación homóloga dentro del locus del gen lo que resulta en reestructuraciones de polinucleótidos.

Los promotores específicos de un tejido (es decir, preferidos de un tejido) o específicos de un órgano conducen a la expresión génica en un determinado tejido tal como en el grano, raíz, hoja o tapetum de la planta. Los promotores específicos de la etapa de desarrollo y de tejidos derivan 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 permiten la expresión específica de genes heterólogos en un tejido y/o de manera selectiva en etapas de desarrollo, que indican la expresión del gen heterólogo de manera diferencial en varios órganos, tejidos y/o momentos, pero no en otro. Por ejemplo, el aumento de la resistencia de una planta a la infección por los patógenos transmitidos por la tierra se puede lograr mediante la transformación del genoma vegetal con un gen de resistencia a los patógenos, de forma que la proteína de resistencia a los patógenos se expresa de manera fuerte 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, tal como, por ejemplo, la elongación o división celular. Otra aplicación es la conveniencia de utilizar promotores específicos de tejidos, por ejemplo, tales que puedan limitar la expresión de los transgenes que codifican un rasgo agronómico en el desarrollo del xilema. Un problema

particular que permanece en la identificación de promotores específicos de tejidos es cómo identificar los genes potencialmente más importantes y sus promotores correspondientes, y relacionar estos con las propiedades específicas de desarrollo de la célula. Otro problema es clonar todos los elementos importantes de control transcripcionales que actúan con *cis* para que el fragmento de ADN clonado conduzca la transcripción en el patrón de expresión específico deseado. Dado que tales elementos de control están localizados distalmente del inicio de la traducción o sitio de inicio, el tamaño del polinucleótido que se selecciona para comprender el promotor es importante para proporcionar el nivel de expresión y los patrones de expresión de la secuencia de polinucleótidos promotora. Un problema particular es identificar los promotores específicos de tejidos, relacionados con tipos de células específicas, etapas de desarrollo y/o funciones en la planta que no están expresadas en otros tejidos vegetales.

Se proporcionan métodos y construcciones que utilizan elementos reguladores del promotor del gen de unión a la clorofila *a/b* de *Zea mays* para expresar los transgenes en la planta. En una modalidad, un promotor puede ser un promotor

del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa de:

GCACAAAATACATAAACTAGATTAGAAAAGGAAGAGAATACGCCAAATTGCAGCTTAATC
AATTAGACGATTTAGTCCTGTTTTTACGAAACAATTGTTTAAGATAACATTAGGACATGTA
CAATATGTGTCTTTGGATGTGTTTAAGGAGTAAATGTAAAAAAATAGATACGTCTCTTAA
CGAAGTCATTGTGTCTTGGCTCTATGCTCGAGACGGAGAAATAGCTAATTGATTAATTTAA
TTTATTGAATGTTCTTATTGGTGTAAATGAATATAGTAAGGCACTGGCCTTATACTTGGAGT
TTGGCATGTCTTATGCTATGTTGCAACAGGCCCGGTCTTGACATTTCTGGGGGCCCTAAGA
GAAAATTTATATAGAGGTCCTATACGAAAATTTGAGTCTGTTATTTTTTCAACTTTTAAAT
AATATATGAAAAATAAAAAATTGATGATTTACATAATTTTATTCAAATGATATGACTGGA
AATATTGTTACAGTATTTTATGAGTCGTAAAATTATATAAATTATGTAATATACATTTGTT
TTGACTTTTGAGAGAGTATTTTTACTTTTAATTTGTCAAACCTAGCCTAAACCTTAAAATAC
ACAGTAAACCAAATCTAAATACATTAGATCAAATTTTCTGAAAATAAAGTTCAGCAAACCTA
AACTAGGATTAATCAATGTAGGTTATTAGGGTCGACCCTTCGGTAGGCTAGAATTAAGCAA
CGCGATAGGCACAGGTGTACAACACCTTTCTGTCCTTCCACGTCAATTTTAGGGCCTGTTT
GGTTCACGGCTAATTATGCCACACTTTGCCTAAGGTTAGTCGTCCGAATTGAAGAACTAAC
CTTATGCAGAAAAGTTAGGCAAAGTATGGCAAGTTAGGTAGTAAACCAAACAGGCCAAAGT
ATTTGTCATCAAGCAGACGGTTGCGCGACCTCAAAGAGATGATTGCTAGAAAATAAAGAGA
CGCAACAAAAGAATGAAAATATAGATTTATCTATAACTTATATGCATTTGATATAAGATAG
ATAAATGGGAGCCCTACGAACCTTGAGGCTCTGAGCAGTCGCATATCCTGCACACCCTTGG
CGCCGGCCCTGGTTGCAAATATGCAATTGTGTCCTTATCCGCGACTGGTCACGAGGCTAGG
ATTGATCGAAAGCTGCCGATGAGAAATGGCAAGGGCGGCATGCTGTGGCCTTTTTTTTACG

GTCTGTCAGGACAACTGAAAAGTTACAAATTTATAGTGGTTGTAAACAGCAACACGTTAAA
AAGTCGATTATCAGTTTCACAGAAAGAGGTCGTTAAAACCGCCAGCAAGCTTGTTTCACTA
TCAGTCTGTCGCTAAGACAATCTCTTTCACCAAAAATACAATTTGCTTTCTTGCCGTTGCT
TCAAGTGAAAATCTTAATGTTTTAAATTAAAATATGTGGCTCTACGTAGGAAAAAATAATT
CAATCGAGTCTCATTTTCATAAAAAAAATTTGGTCAAAAAATTATACACCATCTCGCTCAAG
TGA CTCAAATATACTAAACGGTACTGAGCTGTCTTATAATATAAATTTGATTTACTGTTAG
AATATGATGTTTTATGAGTGCACTAAATTCTATAAAATATATTTATTTTTAAATTATAAGA
TATTTTTATAGGTCTGCTCTTAGAGAGAGCTAAAAAAGAGAGAGGCTGTCTGAAGAAAAAT
CCATAACCAACGCAAAATCCCGGGCGCCCAATCAGCCTTCTCCGCGGAGATTCCTAGCCTC
AGCCAGAGCTACCTCATCTGCGTGAGGCTCCGGTGGCGCCAAGTGTTCCGGCATCCCGGAC
GCACCAATGGCATCCGAGCAACAGATCTTTTCTGCAACAACGCTTCGCGTCGCGGCGGTGT
TTCCCTCCATCTGCTCTGCTCTTTAAATACCTCCGTCGTCTCCTCGTCTCCACAGCATCTC
AAGTCTTCACACTCCTCGCCATCACATAAAACCAAGTGCAAGCAGAAGCAGCGCA (SEQ
ID NO:1)

En una modalidad, un promotor puede ser un promotor anterior del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa de:

GCACAAAATACATAAACTAGATTAGAAAAGGAAGAGAATACGCCAAATTGCAGCTTAATC
AATTAGACGATTTAGTCCTGTTTTTACGAAACAATTGTTTAAGATAACATTAGGACATGTA
CAATATGTGTCTTTGGATGTGTTTAAGGAGTAAATGTAAAAAAATAGATACGTCTCTTAA
CGAAGTCATTGTGTCTTGGCTCTATGCTCGAGACGGAGAAATAGCTAATTGATTAATTTAA
TTTATTGAATGTTCTTATTGGTGTAATGAATATAGTAAGGCACTGGCCTTATACTTGGAGT

TTGGCATGTCTTATGCTATGTTGCAAACAGGCCCGGTCTTGACATTTTCGGGGGCCCTAAGA
GAAAATTTATATAGAGGTCCTATACGAAAATTTGAGTCTGTTATTTTTTCAACTTTTAAAT
AATATATGAAAAATAAAAAATTGATGATTTACATAATTTTATTCAAAATGATATGACTGGA
AATATTGTTACAGTATTTTATGAGTCGTAAAATTATATAAATTATGTAATATACATTTGTT
TTGACTTTTGAGAGAGTATTTTTACTTTTAATTTGTCAAACCTAGCCTAAACCTTAAAATAC
ACAGTAAACCAAATCTAAATACATTAGATCAAATTTTCTGAAAATAAAGTTCAGCAAACCTA
AACTAGGATTAATCAATGTAGGTTATTAGGGTCGACCCTTCGGTAGGCTAGAATTAAGCAA
CGCGATAGGCACAGGTGTACAACACCTTTTCGTCCTTCCCACGTCAATTTTAGGGCCTGTTT
GGTTCACGGCTAATTATGCCACACTTTGCCTAAGGTTAGTCGTCCGAATTGAAGAACTAAC
CTTATGCAGAAAAGTTAGGCAAAGTATGGCAAGTTAGGTAGTAAACCAAACAGGCCAAAGT
ATTTGTCATCAAGCAGACGGTTGCGCGACCTCAAAGAGATGATTGCTAGAAAATAAAGAGA
CGCAACAAAAGAATGAAAATATAGATTTATCTATAACTTATATGCATTTGATATAAGATAG
ATAAATGGGAGCCCTACGAACCTTGAGGCTCTGAGCAGTCGCATATCCTGCACACCCTTGG
CGCCGGCCCTGGTTGCAAATATGCAATTGTGTCCTTATCCGCGACTGGTCACGAGGCTAGG
ATTGATCGAAAGCTGCCGATGAGAAATGGCAAGGGCGGCATGCTGTGGCCTTTTTTTTACG
GTCTGTCAGGACAACTGAAAAGTTACAAATTTATAGTGGTTGTAAACAGCAACACGTTAAA
AAGTCGATTATCAGTTTCACAGAAAGAGGTCGTTAAAACCGCCAGCAAGCTTGTTTCACTA
TCAGTCTGTCGCTAAGACAATCTCTTTCACCAAAAATACAATTTGCTTCTTGCCGTTGCT
TCAAGTGAAAATCTTAATGTTTTAAATTAAAATATGTGGCTCTACGTAGGAAAAATAATT
CAATCGAGTCTCATTTTATAAAAAAATTTGGTCAAAAAATTATACACCATCTCGCTCAAG
TGA CTCAAATATACTAAACGGTACTGAGCTGTCTTATAATATAAATTTGATTTACTGTTAG
AATATGATGTTTTATGAGTGCACTAAATTCTATAAAATATATTTATTTTTAAATTATAAGA

TATTTTTATAGGTCTGCTCTTAGAGAGAGCTAAAAAGAGAGAGGCTGTCTGAAGAAAAAT
CCATAACCAACGCAAAATCCCGGGCGCCCAATCAGCCTTCTCCGCGGAGATTCCTAGCCTC
AGCCAGAGCTACCTCATCTGCGTGAGGCTCCGGTGGCGCCAAGTGTTCCGGCATCCCGGAC
GCACCAATGGCATCCGAGCAACAGATCTTTTCTGCAACAACGCTTCGCGTCGCGGCG
(SEQ ID NO:2)

En una modalidad, un promotor puede ser un promotor del
gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificado de:
GCACAAAATACATAAACTAGATTAGAAAAGGAAGAGAATACGCCAAATTGCAGCTTAATC
AATTAGACGATTTAGTCCTGTTTTTACGAAACAATTGTTTAAGATAACATGGCCTTATACT
TGGAGTTTGGCATGTCTTATGCTATGTTGCAAACAGGCCCGGTCTTGACATTTCTGGGGGCC
CTAAGAGAAAATTTATATAGAGGTCCTATACGAAAATTTGAGTCTGTTATTTTTTCAACTT
TTAAATAATATATGAAAAATAAAAAATTGATGATTTACATAATTTTATTCAAATGATATG
ACTGGAAATATTGTTACAGTATTTTATGAGTCGTAAAATTATATAAATTATGTAATATACA
TTTGTTTTGACTTTTGAGAGAGTATTTTTACTTTTAATTTGTCAAACCTAGCCTAAACCTTA
AAATACACAGTAAACCAAATCTAAATACATTAGATCAAATTTTCTGAAAATAAAGTTCAGC
AACTAACTAGGATTAATCAATGTAGGTTATTAGGGTCGACCCTTCGGTAGGCTAGAATT
AAGCAACGCGATAGGCACAGGTGTACAACACCTTTCGTCCTTCCCACGTCAATAAAGTATT
TGTCATCAAGCAGACGGTTGCGCGACCTCAAAGAGATGATTGCTAGAAAATAAAGAGACGC
AACAAAAGAATGAAAATATAGATTTATCTATAACTTATATGCATTTGATATAAGATAGATA
AATGGGAGCCCTACGAACCTTGAGGCTCTGAGCAGTCGCATATCCTGCACACCCTTGCGCG
CGGCCCTGGTTGCAAATATGCAATTGTGTCTTATCCGCGACTGGTCACGAGGCTAGGATT
GATCGAAAGCTGCCGATGAGAAATGGCAAGGGCGGCATGCTGTGGCCTTTTTTTTACGGTC

TGTCAGGACAACCTGAAAAGTTACAAATTTATAGTGGTTGTAAACAGCAACACGTTAAAAAG
TCGATTATCAGTTTCACAGAAAGAGGTCGTTAAAACCGCCAGCAAGCTTGTTTCACTATCA
GTCTGTCGCTAAGACAATCTCTTTCACCAAAAATACAATTTGCTTTCTTGCCGTTGCTTCA
AGTGAAAATCTGAGCTAAAAAGAGAGAGGCTGTCTGAAGAAAAATCCATAACCAACGCAA
AATCCCGGGCGCCCAATCAGCCTTCTCCGCGGAGATTCTAGCCTCAGCCAGAGCTACCTC
ATCTGCGTGAGGCTCCGGTGGCGCCAAGTGTTCCGGCATCCCGGACGCACCAATGGCATCC
GAGCAACAGATCTTTTCTGCAACAACGCTTCGCGTCGCGGCGGTGTTTCCCTCCATCTGCT
CTGCTCTTTAAATACCTCCGTCGTCTCCTCGTCTCCACAGCATCTCAAGTCTTCACACTCC
TCGCCATCACATAAAACAGTGCAAGCAGAAGCAGCGCA (SEQ ID NO:3)

En una modalidad, un promotor puede ser un promotor anterior del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificado de:

GCACAAAATACATAAACTAGATTAGAAAAGGAAGAGAATACGCCAAATTGCAGCTTAATC
AATTAGACGATTTAGTCCTGTTTTTACGAAACAATTGTTTAAGATAACATGGCCTTATACT
TGGAGTTTGGCATGTCTTATGCTATGTTGCAAACAGGCCCGGTCTTGACATTTCTGGGGGCC
CTAAGAGAAAATTTATATAGAGGTCCTATACGAAAATTTGAGTCTGTTATTTTTTCAACTT
TTAAATAATATATGAAAAATAAAAAATTGATGATTTACATAATTTTATTCAAATGATATG
ACTGGAAATATTGTTACAGTATTTTATGAGTCGTAAAATTATATAAATTATGTAATATACA
TTTGTTTTGACTTTTGAGAGAGTATTTTACTTTTAATTTGTCAAACCTAGCCTAAACCTTA
AAATACACAGTAAACCAAATCTAAATACATTAGATCAAATTTTCTGAAAATAAAGTTCAGC
AACTAACTAGGATTAATCAATGTAGGTTATTAGGGTCGACCCTTCGGTAGGCTAGAATT
AAGCAACGCGATAGGCACAGGTGTACAACACCTTTCGTCTTCCCACGTCAATAAAGTATT

TGTCATCAAGCAGACGGTTGCGCGACCTCAAAGAGATGATTGCTAGAAAATAAAGAGACGC
AACAAAAGAATGAAAATATAGATTTATCTATAACTTATATGCATTTGATATAAGATAGATA
AATGGGAGCCCTACGAACCTTGAGGCTCTGAGCAGTCGCATATCCTGCACACCCTTGGCGC
CGGCCCTGGTTGCAAATATGCAATTGTGTCCTTATCCGCGACTGGTCACGAGGCTAGGATT
GATCGAAAGCTGCCGATGAGAAATGGCAAGGGCGGCATGCTGTGGCCTTTTTTTTACGGTC
TGTCAGGACAACCTGAAAAGTTACAAATTTATAGTGGTTGTAAACAGCAACACGTTAAAAAG
TCGATTATCAGTTTTCACAGAAAGAGGTCGTTAAAACCGCCAGCAAGCTTGTTTCACTATCA
GTCTGTCGCTAAGACAATCTCTTTCACCAAAAATACAATTTGCTTTCTTGCCGTTGCTTCA
AGTGAAAATCTGAGCTAAAAAGAGAGAGGCTGTCTGAAGAAAAATCCATAACCAACGCAA
AATCCCGGGCGCCCAATCAGCCTTCTCCGCGGAGATTCTAGCCTCAGCCAGAGCTACCTC
ATCTGCGTGAGGCTCCGGTGGCGCCAAGTGTTCCGGCATCCCGGACGCACCAATGGCATCC
GAGCAACAGATCTTTTCTGCAACAACGCTTCGCGTCGCGGCG (SEQ ID NO:4)

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor. En una modalidad, un promotor puede ser un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de la presente descripción. En una modalidad, un casete de expresión génica 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:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unido de manera operativa

a un transgén. En una modalidad, un casete de expresión génica que comprende el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* puede conducir la expresión de dos o más transgenes. En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* 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.

La expresión del transgén también se puede regular mediante una región intrón ubicada posteriormente de la secuencia promotora. Tanto un promotor como un intrón pueden regular la expresión de transgenes. Si bien es necesario un promotor para conducir la transcripción, la presencia de un intrón puede aumentar los niveles de expresión que resultan en una transcripción de ARNm para la traducción y la síntesis de proteínas. Una región génica intrón ayuda a estabilizar la expresión de un transgén.

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*. En una modalidad, el intrón puede ser un intrón de gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* (1) de:

GTGTTTCCCTCCATCTGCTCTGCTCTTTAAATACCTCCGTCGTCTCCTCGTCTCCACAG
(SEQ ID NO:5)

En una modalidad, un intrón puede ser el intrón de gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* (2) de:

GTGGAGGCGCCACCGCCACCGGCCACCGCTGCGGATATCTAG (SEQ ID NO:6)

En una modalidad, un casete de expresión génica 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:5 o SEQ ID NO:6. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón de un gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está unido de manera operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor del gen de *Zea mays* o un promotor que tiene origen en una planta (por ejemplo, el promotor de gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* o un promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays*), un virus (por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo,

Agrobacterium tumefaciens delta mas). En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un intrón de un gen de unión a la clorofila a/b de *Z. mays* 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.

La expresión de transgenes también se puede regular con una región génica no traducida 3' (es decir, 3'-UTR) ubicada posteriormente a la secuencia de codificación del gen. Tanto un promotor como una 3'-UTR pueden regular la expresión de transgenes. Mientras que un promotor es necesario para conducir la transcripción, una región génica 3'-UTR puede terminar la transcripción e iniciar la poliadenilación de una transcripción de ARNm resultante para la traducción y la síntesis de las proteínas. Una región génica 3'-UTR ayuda a estabilizar la expresión de un transgén. En una modalidad, una 3'-UTR puede ser una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa de:

GGGGGTGGAGGCGCCACCGCCCACCGGCCACCGCTGCGGATATCTAGGTGTTTCGGATGCAC
GTGAGCGCGCACTGGTTCCAGTTTGTACCATGATGTAAATTACTTACCGTACCAGGGTTCA
ATCGGCAAGGAAGAATTGTTGTGTTCACTGTCTTGGGCAGTCTCTTGGTCCAATATGAATC
AACTTACACAGCATCTCCAAAACTTCTAAAATTACTAGCTGAATGCCCGTGC GTTGCAAC
GGGAATATATAATACCAGTATACTACGATAACTTATATACAAAATGTATGTTATATCGTTA
TGAGAAAATGTTTCATAACCAATTTATGATTCTGGTCATACATAAATTTTGTATTTATAG
TCTATCTGTTTCACCACTACATTGCAACCATCAGTATCATGCAGACTTCGATATATGTTAC
GATTTGTATGGTCTCATTATTGGAGAGCACGTTCCACACATACCGGAAGAAATTTTCTCGT
ACATCGTTAGTCATCAGACACGTACCACCATACTTTTGCTTAAACAAAAATGCAAGTGT
GTGTTTGCGAAGAGAATTAAAGGCAAGTCGACACAAAAGCTACCCCAACGGTGGCGAGGAT
GACGAACTGGTCATTTTTGTGCGTCCTCCCCTGCGTCACCTCTGGCGCCAAGATGACGCCA
TAGTCCTCGATATAGTAATCGTCGAACGCGCGGACATACCGAGTACTGATGACTCTTGGC
TGGGCTGTAAACGAAGTGCACCCCGGGCTCATCAGCAAGGTAGTACCCCTGGTCGTTGCA
CTACCGGATGCGCTACTACTCTACATGCATCGTGTTTCGAGGATACTCATACAACGTCAGCA
ACGGCTATCGTCTCAGTGCACAAGAATTCATGCCTAGTCAGTAGCGACTTACGTGGCTGGT
TGGGCTTCAGGTGAACGATGAGCTGGACAACGTGATGGCGTCGTCGTCGAATGCAGTGCCC
AGAACAACCCGAAAGTCGCCGACG (SEQ ID NO:7)

En una modalidad, una 3'-UTR puede ser una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificada de:

GGGGGTGGAGGCGCCACCGCCCACCGGCCACCGCTGCGGATATCTAGGTGTTTCGGATGCAC
GTGAGCGCGCACTGGTTCCAGTTTGTACCATGATGTAAATTACTTACCGTACCAGGGTTCA
ATCGGCAAGGAAGAATTGTTGTGTTCACTGTCTTGGGCAGTCTCTTGGTCCAATATGAATC

AACTTACACAGCATCTCCAAAACTTCTAAAATTACTAGCTGAATGCCCGTGCGTTGCAAC
GGGAATATATAATACCAGTATACTACGATAACTTATATACAAAATGTATGTTATATCGTTA
TGAGAAAATGTTTCATAACCAATTTATGATTCTGGTCATACATAAATTTTGTATTATATAG
TCTATCTGTTTCACCACTACATTGCAACCATCAG (SEQ ID NO:8)

En una modalidad, un casete de expresión génica comprende una 3'-UTR. En una modalidad, una 3'-UTR puede ser una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende una 3'-UTR, donde la 3'-UTR es idéntica en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unida de manera operativa a un transgén. En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende una 3'-UTR 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, un intrón y una 3'-UTR purificados del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende: a) 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:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4; b) 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:5, SEQ ID NO:6; y/o, c) una 3'-UTR, donde la 3'-UTR es idéntica en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8.

Por ejemplo, un casete de expresión génica puede incluir tanto un promotor como una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 1, y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 7. En otra modalidad, un casete de expresión génica puede incluir tanto un promotor como una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 1, y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 8. En una modalidad posterior, un casete de expresión génica puede incluir tanto un promotor como una 3'-UTR, donde

el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 2, y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 7. En aun otra modalidad, un casete de expresión génica puede incluir tanto un promotor como una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 2, y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 8.

En una modalidad adicional, un casete de expresión génica puede incluir tanto un promotor como una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 3, y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 7. En aun otra modalidad, un casete de expresión génica puede incluir tanto un promotor como una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 3, y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 8. En una modalidad, un casete de expresión génica puede incluir tanto un promotor como una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 4, y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 7. En aun otra modalidad, un casete de expresión génica puede incluir tanto un promotor como una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 4, y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 8.

En otra modalidad, el casete de expresión génica puede incluir un promotor, intrón y una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 1, el intrón es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 5 y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 7. En una modalidad adicional, el casete de expresión génica puede incluir un promotor, intrón y una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 1, el intrón es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 5, y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 8. En una modalidad adicional, el casete de expresión génica puede incluir un promotor, intrón y una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 3, el intrón es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 5 y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 7. En una modalidad adicional, el casete de expresión génica puede incluir un promotor, intrón y una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 3, el intrón es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 5 y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 8.

En otra modalidad, el casete de expresión génica puede incluir un promotor, intrón y una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 2, el intrón es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 5 y la 3'-UTR es un

polinucleótido de la SEQ ID NO: 7. En una modalidad adicional, el casete de expresión génica puede incluir un promotor, intrón y una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 2, el intrón es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 5 y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 8. En una modalidad adicional, el casete de expresión génica puede incluir un promotor, intrón y una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 4, el intrón es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 5 y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 7. En una modalidad adicional, el casete de expresión génica puede incluir un promotor, intrón y una 3'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 4, el intrón es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 5 y la 3'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 8.

En una modalidad, una 5'-UTR puede ser una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificada:

CATCTCAAGTCTTCACACTCCTCGCCATCACATAAAACCAGTGCAAGCAGAAGCAGCGCA
(SEQ ID NO:19)

En una modalidad, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende una 5'-UTR, donde la 5'-UTR es idéntica en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ

ID NO:19. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR. En una modalidad, una 5'-UTR puede ser una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR, donde la 5'-UTR es idéntica en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO:19. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unida de manera operativa a un transgén. En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR 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, un intrón y una 5'-UTR purificada del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende: a) 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:19.

93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %, o 100 % a la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4; b) 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:5, SEQ ID NO:6; y/o, c) una 5'-UTR, donde la 5'-UTR es idéntica en al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % a la SEQ ID NO:19.

Por ejemplo, un casete de expresión génica puede incluir un promotor y una 5'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 1, y la 5'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 19. En una modalidad posterior, un casete de expresión génica puede incluir un promotor y una 5'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 2, y la 5'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 19.

En una modalidad adicional, un casete de expresión génica puede incluir un promotor y una 5'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 3, y la 5'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 19. En aun otra modalidad, un casete de expresión génica puede incluir un promotor y una 5'-

UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 4, y la 5'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 19.

En otra modalidad, el casete de expresión génica puede incluir un promotor, intrón y una 5'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 2, el intrón es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 5 y la 5'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 19. En una modalidad adicional, el casete de expresión génica puede incluir un promotor, intrón y una 5'-UTR, donde el promotor es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 4, el intrón es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 5 y la 5'-UTR es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 19.

Un promotor, un intrón, una 3'-UTR y/o una 5'-UTR pueden estar unidos de manera operativa a diferentes transgenes dentro de un casete de expresión génica cuando un casete de expresión génica incluye uno o más transgenes. En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un promotor del gen de *Z. mays* (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4) 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 promotor del gen de *Z. mays* (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4), un intrón (SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6), y una 5'-UTR (SEQ ID NO:19) que se encuentran unidos 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 una 3'-UTR de gen de *Z. mays* (SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8) 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 otra

modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR de gen de *Z. mays* (SEQ ID NO:19) 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 vector comprende 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 o en el direccionamiento de genes tal como un ADN de donante.

En una modalidad, una célula o una planta comprenden un casete de expresión génica tal como se describe en la presente. En una modalidad, una célula o una planta comprenden 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 como se describe en la presente es una célula transgénica o una planta transgénica, respectivamente. En una modalidad, una planta transgénica puede ser una planta monocotiledónea. En una modalidad, una planta monocotiledónea transgénica puede ser, de modo no taxativo, maíz, trigo, sorgo, avena, centeno, bananas, caña de azúcar y mijo. En una modalidad, una planta transgénica puede ser una planta dicotiledónea. En una modalidad, una planta dicotiledónea transgénica puede ser, de modo no taxativo, soja, algodón, girasol y canola. Una modalidad también incluye una semilla transgénica de una planta transgénica, según se describe en la presente.

En una modalidad, un casete de expresión génica incluye dos o más transgenes. Los dos o más transgenes pueden estar unidos de manera operativa a un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*, intrón, o 3'-UTR como se describe en la presente. En una modalidad, un casete de expresión génica incluye uno o más transgenes. En una modalidad con uno o más transgenes, al menos un transgén está unido de manera operativa a un intrón, 3'-UTR o promotor del

gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de la presente descripción.

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, incluyendo, por ejemplo, la secuenciación de ADN y PCR (reacción en cadena de la polimerasa), transferencia Southern, transferencia de ARN, métodos inmunológicos para la detección de una proteína expresada del vector, por ejemplo, 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), DsRed, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), fosfatasa alcalina y similares (ver Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001).

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 neomicina fosfotransferasa II (NEO) e higromicina fosfotransferasa (HPT) así como también genes que confieren tolerancia a compuestos herbicidas. Los genes de tolerancia a herbicidas generalmente codifican para una proteína objetivo modificada que es insensible al herbicida o para una enzima que degrada o desintoxica al herbicida en la planta antes de que pueda actuar. Por ejemplo, la tolerancia al glifosato se ha obtenido usando genes que codifican para enzimas objetivo mutantes, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Los genes y mutantes para EPSPS son bien conocidos y se describen en detalle a continuación. La tolerancia al amonio de glufosinato, bromoxinilo y 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) se ha obtenido 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, son bien conocidos los herbicidas que pueden inhibir el punto de crecimiento o meristemo, incluyendo imidazolinona o sulfonilurea y los genes para la resistencia/tolerancia de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) y acetolactato sintasa (ALS) para estos herbicidas. Los genes de tolerancia a glifosato incluyen 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSP) mutantes y 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 de *Streptomyces*, incluyendo *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/o ciclohexanedionas (incluyendo Haloxifop, Diclofop, Fenoxiprop, Fluazifop, Quizalofop) incluyen genes de acetil coenzima A carboxilasa (ACCasa)--*Acc1-S1*, *Acc1-S2*, y *Acc1-S3*. En una modalidad, los herbicidas pueden inhibir la fotosíntesis, inclusive la triazina (genes *psbA* y *1s+*) o benzonitrilo (gen nitrilasa).

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

Una modalidad también incluye genes que codifican resistencia a: cloranfenicol; metotrexato; higromicina; espectinomomicina; 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 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 expresión en las plantas. Un gen marcador seleccionable se puede optimizar para la expresión en una especie de planta particular o de manera alternativa se puede modificar para la expresión óptima en las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los codones preferidos de las plantas se pueden determinar a partir de codones de frecuencia más alta en las proteínas expresadas en la cantidad más grande en las especies de plantas de interés particulares. En una modalidad, un gen marcador seleccionable está diseñado para ser expresado en plantas a un nivel más alto, lo que resulta en una eficiencia de transformación mayor. Los métodos para la optimización vegetal de genes son bien conocidos. Las guías para la optimización y fabricación de secuencias de polinucleótidos sintéticas se pueden encontrar en, por ejemplo, W02013016546, W02011146524, W01997013402, patente estadounidense n.º 6166302 y patente estadounidense n.º 5,380,831.

Transgenes

Los métodos y composiciones descritos pueden utilizarse para la expresión de secuencias génicas de polinucleótidos dentro del genoma de la planta. Por consiguiente, la expresión de los genes que codifican la tolerancia a herbicidas, resistencia a los insectos, nutrientes, antibióticos o moléculas terapéuticas puede ser conducida por un promotor vegetal.

En una modalidad, el elemento regulador del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de la presente descripción se combina o se une de manera operativa a un gen que codifica secuencias de polinucleótidos que proporcionan resistencia o tolerancia al glifosato u otro herbicida, y/o proporciona resistencia a enfermedades o insectos seleccionados y/o mejoras nutricionales, y/o características agronómicas mejoradas, y/o 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 de un genoma de vegetal. El apilamiento se puede lograr, por ejemplo, a través del fitomejoramiento convencional utilizando dos o más eventos de los siguientes: transformación de un vegetal con

una construcción que contiene las secuencias de interés, retransformación de una planta transgénica, o adición de nuevos rasgos a través de la integración direccional mediante la recombinación homóloga.

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

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

- (A) Genes de resistencia a enfermedades de las plantas. Las defensas de las plantas a menudo se activan mediante interacción específica entre el producto de un gen de resistencia a las enfermedades (R) en la planta y el producto de un gen de avirulencia correspondiente (Avr) en el patógeno. Una variedad vegetal puede transformarse con el gen de resistencia clonado para modificar genéticamente vegetales que sean resistentes a cepas patógenas específicas. Los ejemplos de dichos genes incluyen el gen Cf-9 del tomate para la resistencia a *Cladosporium fulvum* (Jones *et al.*, 1994 Science 266:789), el gen Pto del tomate, que codifica una proteína quinasa, para la resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. tomate (Martin. *et al.*, 1993 Science 262:1432), y el gen

RSSP2 de *Arabidopsis* para la resistencia a *Pseudomonas syringae* (Mindrinos *et al.*, 1994 Cell 78:1089).

(B) Una proteína de *Bacillus thuringiensis*, un derivado de esta o un polipéptido sintético modelado de la misma, como por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de un gen de la endotoxina d Bt (Geiser *et al.*, 1986 Gen 48:109), y un gen de insecticida vegetativo (VIP) gen (véase, por ejemplo, Estruch *et al.* Natl. Acad. Sci. 93:5389-94). Además, las moléculas de ADN que codifican genes de la endotoxina d se pueden adquirir en American Type Culture Collection (Rockville, Md.), bajo los números de acceso de 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 al.*, 1994 Plant Molec. Biol. 24:825).

(D) Una proteína de unión a vitaminas, tal como avidina y homólogos de avidina que son útiles como larvicidas contra plagas de insectos. Ver la 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 al.*, 1987 J. Biol. Chem. 262:16793), un

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

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

(G) Un péptido o neuropéptido específico de los insectos que, al momento 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 Gene 116: 165).

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

(J) Una enzima involucrada en la modificación, incluyendo la modificación postraducciona, de una molécula biológicamente activa; por ejemplo, enzima glicolítica, una enzima proteolítica, una enzima lipolítica, una nucleasa, una ciclasa, una transaminasa, una esterasa, una hidrolasa, una fosfatasa, una cinasa, una fosforilasa, una polimerasa, una elastasa, una quitinasa y una glucanasa, ya sean naturales o sintéticas. Los ejemplos de dichos genes incluyen, un gen de callasa (solicitud PCT publicada W093/02197), secuencias que codifican la quitinasa (que se puede obtener, por ejemplo, de la ATCC con los números de acceso 3999637 y 67152), quitinasa del gusano del tabaco (Kramer *et al.*, 1993 Insect Molec. Biol. 23:691), y el gen de poliubiquitina ubi4-2 del perejil (Kawalleck *et al.*, 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 al.*, 1994 Plant Molec. Biol. 24:757) y una

secuencia de nucleótidos de un clon de ADNc de calmodulina de maíz (Griess *et al.*, 1994 Plant Physiol. 104:1467).

(L) Un péptido de momento hidrofóbico. Ver la patente estadounidense n.º 5,659,026 y 5,607,914; la última enseña péptidos antimicrobianos sintéticos que confieren resistencia 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 al.*, 1993 Plant Sci. 89:43) que hace a las plantas de tabaco transgénicas resistentes a las *Pseudomonas solanacearum*.

(N) Una proteína viral invasiva o una toxina compleja derivada de la misma. Por ejemplo, la acumulación de proteínas de la cubierta viral en células vegetales transformadas proporciona resistencia a la infección viral y/o al desarrollo de enfermedades efectuado por el virus a partir del cual se deriva el gen de la proteína de la cubierta, así como por virus relacionados. La resistencia mediada por proteínas de la 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 del cascabel del tabaco y virus del mosaico del tabaco. Véase, por ejemplo, Beachy *et al.*, (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 al.*, (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. Ver, por ejemplo, Tavladoraki *et al.*, (1993) Nature 266:469, que muestra que las 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- α -1,4-D-galacturonasa de la pared celular del vegetal (Lamb *et al.*, 1992 Bio/Technology

10:1436). La clonación y caracterización de un gen que codifica una proteína inhibidora de endopoligalacturonasa de haba se describe por Toubart *et al.* (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 enfermedades fúngicas (Logemann *et al.*, 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 doble cadena parcial o totalmente, lo que desencadena una respuesta de silenciamiento, dando como resultado la escisión del RNAcd en pequeños ARN de interferencia, que luego se incorporan en un complejo de direccionamiento que destruye los ARNm homólogos. Véanse, por ejemplo, Fire *et al.*, patente estadounidense n.º 6,506,559; Graham *et al.*, 6,573,099.

2. Genes que confieren tolerancia a un herbicida

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

(B) Uno o más genes adicionales que codifican la resistencia o tolerancia al glifosato impartidas por los genes de la sintasa EPSP mutante y genes *aroA*, o a través de la inactivación metabólica mediante genes tales como DGT-28, 2mEPSPS, GAT (glifosato acetiltransferasa) o GOX (glifosato oxidasa) y otros compuestos fosfono, tales como glufosinato (genes *pat*, *bar*, y DSM-2), y ácidos ariloxifenoxipropiónicos y ciclohexanodionas (genes que codifican el inhibidor de ACCasa). Ver, por ejemplo, patente estadounidense n.º 4,940,835, que describe la secuencia de nucleótidos de una forma de EPSP que puede conferir resistencia al glifosato. Una molécula de ADN, que codifica un gen *aroA* mutante, se puede obtener con el número de acceso de ATCC 39256, y la secuencia de nucleótidos del 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 europea n.º 0 242 246. De Greef *et al.* (1989 Bio/Technology 7:61) describe la producción de plantas transgénicas que expresan genes bar quiméricos que codifican la actividad de la fosfinotricinacetil-transferasa. Son ejemplos de genes que confieren resistencia a ácidos ariloxifenoxi propiónicos y a ciclohexanodionas, tales como setoxidim y haloxifop, los genes Acc1-S1, Acc1-S2 y Acc1-S3, descritos por Marshall *et al.*, (1992 Theor. Appl. Genet. 83:435).

(C) Los 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). Przibilla *et al.*, (1991 Plant Cell 3:169) describe la transformación de Chlamydomonas con el uso de 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 una glutathione S-transferasa se describe por Hayes *et al.* (1992 Biochem. J. 285:173).

(D) Los genes que codifican la resistencia o tolerancia a herbicidas que se unen a hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), enzimas que catalizan la reacción en la cual el parahidroxifenilpiruvato (HPP) se transforma en homogentisato. Esto incluye herbicidas tales como isoxazoles (EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, patente estadounidense n.º 5,424,276), en particular isoxaflutol, que es un herbicida selectivo para el maíz, dicetonitrilos (EP496630, EP496631), en particular 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-sulfonamido-4-(trifluorometil)fenil)propano-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-sulfonamido-4-(2,3-diclorofenil)propano-1,3-diona, tricetonas (EP625505, EP625508, patente estadounidense n.º 5,506,195), en particular sulcotriona, y pirazolinatos. Un gen que produce una sobreabundancia de HPPD en las plantas 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 20030066102.

(E) Los 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) Los 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 piridiloxi auxina, tales como fluoroxipir o triclopir. Los ejemplos de estos genes incluyen el gen de la enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato (aad-12), que se describe en WO 2007/053482 A2.

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

(H) Los 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) Los 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 (PS II) (Véase Brussian *et al.*, (1989) EMBO J. 1989, 8(4): 1237-1245).

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 de la planta (Knultzon *et al.*, 1992 Proc. Nat. Acad. Sci. EUA 89:2624).

(B) Disminución del contenido de fitato

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

(2) Se podría introducir un gen que reduzca el contenido de fitato. 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 al.*, 1990 Maydica 35:383).

(C) La modificación de la composición de carbohidratos efectuada, por ejemplo, mediante la transformación de plantas 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 al.*, 1988 J. Bacteriol. 170:810), genes de levansucrasa *Bacillus subtilis* (Steinmetz *et al.*, 1985 Mol. Gen. Genel. 200:220), α -amilasa *Bacillus licheniformis* (Pen *et al.*, 1992 Bio/Technology 10:292), genes de invertasa de tomate (Elliot *et al.*, 1993 Plant Mol. Biol. 21:515-524), gen de amilasa de la cebada (Sogaard *et al.*, 1993 J. Biol. Chem. 268:22480) y la enzima de ramificación de almidón de endospermo de maíz II (Fisher *et al.*, 1993 Plant Physiol. 102:10450).

Transformación

Los métodos para la transformación de plantas adecuados incluyen cualquier método mediante el que se pueda introducir ADN a una célula, por ejemplo, de modo no taxativo:

electroporación (ver, por ejemplo, la patente estadounidense 5,384,253); bombardeo de microproyectiles (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5,015,580, 5,550,318, 5,538,880, 6,160,208, 6,399,861 y 6,403,865); transformación mediada por *Agrobacterium* (ver, por ejemplo, las 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, la patente estadounidense 5,508,184). Estos métodos pueden utilizarse para transformar de manera estable o transformar de manera transitoria una planta.

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

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, y virus del mosaico de la vena de la yuca y/o virus del mosaico de tabaco, véase, por ejemplo, Chung *et al.* (2006) *Trends Plant Sci.* 11(1):14.

A través de la aplicación de técnicas de transformación, las células de prácticamente cualquier especie vegetal 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 particularmente útiles en el contexto de la transformación de algodón se describen en las patentes estadounidenses n.º 5,846,797, 5,159,135, 5,004,863 y 6,624,344; las técnicas para transformar plantas *Brassica* en particular se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5,750,871; las técnicas para transformar la soja se describen por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6,384,301; y las técnicas para transformar el maíz se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 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 generalmente se identifica para la regeneración vegetal y el cultivo adicional. Con el fin de 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 población de células transformadas se puede ensayar mediante la exposición de las células a uno o más agentes selectivos, o las células se pueden analizar para conseguir el rasgo de gen marcador deseado.

Las células que sobreviven a la exposición a un agente selectivo, o las células que han sido calificadas como positivas en un ensayo de análisis se pueden cultivar en un medio que tolera la regeneración de plantas. En una modalidad, cualquier medio de cultivo de tejido vegetal adecuado se puede modificar incluyendo sustancias adicionales, tales como reguladores de crecimiento. El tejido se puede mantener en un medio básico con reguladores de crecimiento hasta que haya tejido suficiente para empezar las tareas de regeneración vegetal, o después de repetidas veces de selección manual, hasta que la morfología del tejido esté preparada para la

regeneración (por ejemplo, al menos 2 semanas), después se transfieren 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 suficientes raíces, las plantas se pueden transferir 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. 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, por ejemplo, mediante medios inmunológicos (ELISA, transferencias Western y/o espectrofotometría LC-MS MS) o mediante función enzimática, ensayos de partes de plantas, tales como ensayos de hojas o raíces; y/o análisis del fenotipo de la planta regenerada completa.

Se pueden analizar los eventos transgénicos, por ejemplo, mediante la amplificación de PCR usando, por ejemplo,

cebadores de oligonucleótido específicos para las moléculas de ácido nucleico de interés. Se entiende que el genotipado por PCR incluye, de modo no taxativo, la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN genómico derivado de tejido de callo de planta huésped aislado 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 genotipado por PCR han sido bien divulgados (ver, por ejemplo, Rios *et al.*, (2002) Plant J. 32:243-53), y se pueden aplicar a ADN genómico derivado de cualquier especie vegetal o tipo de tejido, incluyendo cultivos celulares. Las combinaciones de cebadores de oligonucleótido que se unen tanto a la secuencia objetivo 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 objetivo, secuencias de ácido nucleico introducidas y/o combinaciones de los dos. Por lo tanto, las estrategias de genotipado 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 directos 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 directos 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, en Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA). La amplificación puede estar seguida de clonación y secuenciación, o mediante el

análisis de secuencia directo de productos de amplificación. En una modalidad, los cebadores de oligonucleótidos específicos para el direccionamiento de genes se utilizan en amplificaciones por PCR.

Método para expresar un transgén

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unido de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unido de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un intrón y un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unida de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad,

un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un promotor, intrón y 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unida de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un promotor, intrón y 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unido de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unido de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta que comprende cultivar una planta que comprende un intrón y

un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unida de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta que comprende cultivar una planta que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* y una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unida de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta que comprende cultivar una planta que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* y una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén.

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal que comprende

cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unido de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal que comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unido de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal que comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un intrón y un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal que comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unida de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal que comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* y una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de

Zea mays unidos de manera operativa a al menos un transgén.

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal que comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende una 3'-UTR, intrón y promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén.

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal que comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unida de manera operativa a al menos un transgén.

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal que comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* y una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén.

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal que comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende una 5'-UTR, intrón y promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén.

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unido de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un casete de expresión génica que comprende un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unido de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un casete de expresión génica que comprende un intrón y promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un casete de expresión génica que comprende una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unida de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un

casete de expresión génica que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* y una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un casete de expresión génica que comprende una 3'-UTR, promotor e intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unida de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* y una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un casete de expresión génica que comprende una

5'-UTR, promotor e intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén.

En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de expresión génica, un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de expresión génica, un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de expresión génica, un intrón y promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de

expresión génica, una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de expresión génica, un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* y una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de expresión génica que comprende una 3'-UTR, promotor e intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de expresión génica, una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que

comprende un casete de expresión génica, un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* y una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar al menos un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal comprende cultivar un tejido vegetal o célula vegetal que comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR, promotor e intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a al menos un transgén.

En una modalidad, una planta, tejido vegetal o célula vegetal comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* (que también incluye un promotor anterior). En una modalidad, el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* puede ser la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*, 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: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En una modalidad, una

planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* 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 del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un intrón. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*. En una modalidad, el intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. 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: 5 o SEQ ID NO: 6. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está unido de manera operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor de *Zea mays* o un promotor que tiene origen en una planta (por ejemplo, el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* o promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays*), un virus (por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está 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 del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un

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

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*. En una modalidad, la 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*, donde la 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* 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: 7 o SEQ ID NO: 8. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está unida de manera operativa a un promotor, donde el

promotor es un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* o un promotor que tiene origen en una planta (por ejemplo, el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays*), un virus (por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unida 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 una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está 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, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de

Zea mays. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*. En una modalidad, la 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* es un polinucleótido de la SEQ ID NO: 19. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*, donde la 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* 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: 19. En una modalidad, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está unida de manera operativa a un promotor, donde el promotor es un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* o un promotor que tiene origen en una planta (por ejemplo, el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays*), un virus (por ejemplo, el promotor del virus del mosaico de la vena de la yuca) o una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende una 5'-UTR del gen de

unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unida 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 una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está 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, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* y un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a un transgén. El promotor, el intrón, la 3'-UTR y la 5'-UTR pueden ser 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 del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que

está unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*, un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* y una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a un transgén. El promotor, el intrón, y la 3'-UTR 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 del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está unido de manera

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

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*, un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*, una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* y una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* unidos de manera operativa a un transgén. El promotor, el intrón, la 3'-UTR y la 5'-UTR 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 del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso

de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad ilustrativa, casete de expresión génica comprende un intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos. En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende una 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que está unido de manera operativa a un transgén, donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión a ADN, un transgén marcador seleccionable o combinaciones de estos.

En una modalidad, la expresión de transgenes mediante métodos descritos en la presente se expresa dentro de los tejidos de tallo y hoja de una planta. En una modalidad, la expresión de transgenes incluye más de un transgén expresado en los tejidos de tallo y hoja de una planta. En una modalidad, un método para cultivar una planta transgénica, tal como se describe en la presente, incluye la expresión de transgenes preferidos de tallo y hoja. En una modalidad, un método para la expresión de un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal incluye tejidos preferidos de tallo y hoja y células preferidas de tallo y hoja. En una modalidad, la expresión preferida de tallo y hoja incluye la expresión preferida de tallo y hoja de maíz.

En una modalidad adicional, la expresión de transgenes mediante métodos descritos en la presente se expresa dentro de los tejidos vegetales sobre la superficie del suelo (por ejemplo, los tejidos vegetales sobre la superficie del suelo incluyen hoja, cáscara, tallo y barba). En una modalidad, la expresión de transgenes incluye más de un transgén expresado en los tejidos vegetales sobre la superficie del suelo. En una modalidad, un método para cultivar una planta transgénica, tal como se describe en la presente, incluye la expresión de

transgenes de tejidos vegetales sobre la superficie del suelo. En una modalidad, un método para la expresión de un transgén en un tejido vegetal o célula vegetal incluye tejidos vegetales sobre la superficie del suelo y células vegetales sobre la superficie del suelo. En una modalidad, la expresión del tejido vegetal sobre la superficie del suelo incluye la expresión del tejido vegetal sobre la superficie del suelo del maíz.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un vector que comprende un elemento regulador del intrón, 3'-UTR, 5'-UTR o promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*, tal como se describe en la presente. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un vector que comprende un elemento regulador del intrón, 3'-UTR, 5'-UTR o promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*, tal como se describe en la presente, unido de manera operativa a un transgén. En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal comprende un vector que comprende un casete de expresión génica, tal como se describe en la presente. En una modalidad, un vector puede ser un plásmido, un cósmido, un

cromosoma artificial bacteriano (BAC), un bacteriófago o un fragmento de virus.

En una modalidad, una planta, un tejido vegetal o una célula vegetal de acuerdo con los métodos que se describen en la presente, puede ser una monocotiledónea. El tejido vegetal, célula vegetal o planta monocotiledónea puede ser, de modo no taxativo, maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, cebada, 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. El tejido vegetal, célula vegetal o planta dicotiledónea puede ser, de modo no taxativo, colza, canola, mostaza india, mostaza etíope, soja, girasol y algodón.

Con respecto a la producción de plantas modificadas genéticamente, son conocidos en la técnica los métodos para la modificación genética de las plantas. Por ejemplo, se han desarrollado numerosos métodos para la transformación de plantas, inclusive protocolos de transformación biológica y física para plantas dicotiledóneas, así como para plantas monocotiledóneas (por ejemplo, Goto-Fumiyuki *et al.*, *Nature*

Biotech 17: 282-286 (1999); Miki *et al.*, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. y Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 67-88 (1993)). Adicionalmente, se encuentran disponibles métodos de cultivo *in vitro* y de vectores para la transformación y regeneración de células y tejidos vegetales de plantas, por ejemplo, en Gruber *et al.*, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. y Thompson, J. E. Eds., CRC 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 operable, puede ser introducida en otras plantas mediante cruzamiento sexual. Se puede usar una gran cantidad de técnicas estándares de fitomejoramiento, dependiendo de las especies que se pretenda cruzar.

Se puede identificar y aislar una célula vegetal, callo, tejido o planta transformados mediante la selección o análisis del material vegetal modificado genéticamente en búsqueda de rasgos codificados por los genes marcadores presentes en el ADN transformador. Por ejemplo, la selección puede realizarse mediante el cultivo del material vegetal

modificado genéticamente 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 identificarse mediante la selección de actividades de cualquier gen marcador visible (por ejemplo, los genes yfp, gpf, β -glucuronidasa, luciferasa, B o C1) que pueden encontrarse presentes en construcciones recombinantes de ácido nucleico. Dichas metodologías de selección y revisión son conocidas para el experto en la materia.

Pueden utilizarse 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 por PCR para detectar y determinar la estructura del inserto de ADN recombinante; 2) transferencia Northern, la protección de RNasa S1, la extensión del cebador o la amplificación PCR con transcriptasa inversa para detectar y examinar las transcripciones de ARN de las construcciones génicas; 3) 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 última generación (NGS); 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 utilizarse también técnicas adicionales, tales como hibridación *in situ*, tinción e inmunotinción de enzimas, 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 utilizarse 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 de polipéptidos expresados pueden medirse de forma inmunoquímica, es decir, mediante 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-acetil-transferasa) mediante un ensayo ELISA en la publicación de patente estadounidense n.º 20090093366. El transgén puede ser expresado de forma selectiva en algunos tipos de célula o tejidos vegetales o en algunas etapas del desarrollo, o el transgen puede ser expresado en sustancialmente todos los tejidos vegetales, prácticamente en todo su ciclo de vida. No obstante, también es aplicable cualquier modo de expresión combinatoria.

La presente descripción también abarca las semillas de las plantas transgénicas descritas anteriormente, donde la semilla comprende el transgén o casete de 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 transgén o la construcción génica.

Mientras que la invención ha sido descrita haciendo referencia a métodos y modalidades específicos, será evidente que pueden realizarse varias modificaciones y cambios sin desviarse de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación de elementos reguladores de expresión alta

Los elementos reguladores novedosos del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* se identificaron mediante un enfoque de perfil transcripcional utilizando secuenciación de última generación (NGS). Estos elementos reguladores se identificaron, aislaron y clonaron para caracterizar el perfil de expresión de los elementos reguladores para su uso en plantas transgénicas. Las líneas de maíz transgénico se transformaron de manera estable con un gen *cry34Ab1* aislado de *Bacillus thuringiensis*, y se produjo un gen marcador seleccionable *aad-1* y se evaluaron los niveles de expresión

de transgenes y especificidad de tejidos. Dichos elementos reguladores novedosos del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* se identificaron y caracterizaron. Se describen por primera vez los elementos reguladores del promotor, intrón, 5' UTR y 3'-UTR para su uso en construcciones de expresión génica.

Enfoque de perfil transcripcional:

Se obtuvieron los tejidos de maíz de plantas cultivadas en diferentes etapas del crecimiento y desarrollo de la planta para el perfil transcripcional, con la finalidad de identificar y seleccionar elementos reguladores de genes de maíz natural con perfiles de expresión deseados para su uso en casetes de expresión génica. Por ejemplo, se recolectaron muestras de tejidos de cuatro etapas de desarrollo de hojas (V4 (duplicado), V12 y R3) y cuatro etapas de raíz (tejidos fibrosos y nodales de V12 y V4), polen, barba, elote, grano inmaduro (20 días luego de la polinización), cáscara y tallo (V4 y R1). Se aisló el ARNm total de todos los tejidos descritos anteriormente y se obtuvo ARNm de calidad alta en cantidades deseadas.

A continuación, se prepararon bibliotecas de ADNc de cada una de las muestras de ARNm y se completó la secuenciación de alto rendimiento utilizando un ILLUMINA HiSeq® 2000 (Illumina Inc., San Diego, CA). Adicionalmente, se utilizó el kit de preparación de muestras de ARN ILLUMINA TruSeq® de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante para la preparación de muestras de secuenciación de ARN. En resumen, se purificaron 5 µg de ARN total utilizando perlas magnéticas unidas al oligonucleótido poli-T seguidas por fragmentación en piezas más pequeñas (longitud promedio de alrededor de 200 pb) utilizando cationes divalentes en temperatura alta. A continuación, se utilizaron cebadores aleatorios y transcriptasa inversa SUPERScript® II para copiar el ARNm fragmentado en la primera cadena de ADNc. El ADNc se convirtió posteriormente en ADNc de cadena doble (ADNc cd) utilizando ADN polimerasa I y RNasa H. Los fragmentos de ADNc de cadena doble se sometieron a reparación de extremos, adición de una cola A y posterior ligación a adaptadores indexados de lecturas pareadas (PE, por sus siglas en inglés) de Illumina. Finalmente, se limpiaron y enriquecieron los productos de la biblioteca con 15 ciclos de PCR y se purificaron. Las bibliotecas enriquecidas se

normalizaron a una concentración de 2 nM, se desnaturalizaron con hidróxido de sodio y se diluyeron a 12 pM en amortiguador de hibridación para cargarlas en un único carril de una celda de flujo HiSeq®. Se llevaron a cabo la generación de conglomerados, hibridación de cebadores y reacciones de secuenciación de acuerdo con un protocolo de secuenciación recomendado por el fabricante de Illumina.

Las lecturas de secuenciación se filtraron entonces para quitar lecturas de calidad baja. Se retuvo alrededor del 99,9 % de las lecturas de secuenciación tras el filtrado. Las lecturas de secuenciación se alinearon al genoma de *Zea mays* c.v. B73 disponible en maizeGDB. Se descartaron las lecturas de secuenciación que se mapearon en el genoma del maíz en más de un locus, para evitar la confusión en la identificación de los genes de expresión alta y su posterior caracterización. Esta etapa llevó al alineamiento de >70 % de las lecturas de secuenciación de cada una de las muestras del genoma del maíz. La unidad de expresión génica cuantitativa de los fragmentos por kilobase de exón por millón de fragmentos mapeados (o valores FPKM) se utilizó para clasificar los genes para pruebas de transformación estable que combinaban un patrón de expresión deseable para su uso en construcciones

de expresión génica. Aproximadamente 15-20 genes de expresión alta, que representaban ~0,1 % de los genes expresados de manera más alta en el maíz, se priorizaron para pruebas en líneas transgénicas estables (FIG. 1).

Ejemplo 2: Identificación del elemento regulador génico

Las secuencias de promotor, intrón, 5'-UTR y 3'-UTR se extrajeron de la secuencia del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que se identificó a partir de los enfoques de perfil transcripcional y bioinformática descritos anteriormente. Se proporciona la secuencia aislada y purificada del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*, del genoma de *Zea mays* c.v. B73, como la SEQ ID NO: 9. La secuencia de promotor de longitud completa de 2.006 pb (SEQ ID NO: 1) comprende los pares de bases 1-2006 de la SEQ ID NO: 9. La secuencia del promotor anterior de 1.887 pb (SEQ ID NO: 2) comprende los pares de bases 1-1.887 de la SEQ ID NO: 9. La secuencia de intrones de 59 pb (SEQ ID NO: 5) comprende los pares de bases 1.888-1.946 de la SEQ ID NO: 9. La secuencia de 5'-UTR de 60 pb (SEQ ID NO: 19) comprende los pares de bases 1.947-2.006 de la SEQ ID NO: 9. Los codones de inicio y terminación de la traducción ATG y TGA que flanquean

la secuencia de codificación comprenden los pares de bases 2.007-2.009 y 2.802-2.804, respectivamente, de la SEQ ID NO: 9. La secuencia de 3'-UTR de 1.000 pb (SEQ ID NO: 7) comprende los pares de bases 2.805-3.804 de la SEQ ID NO: 9. Un segundo intrón de 43 pb (SEQ ID NO: 6) se identifica dentro de la 3'UTR y comprende los pares de bases 2.809-2.851 de la SEQ ID NO: 9.

Los elementos de ADN se amplificaron o se sintetizaron y se clonaron en vectores de entrada. Los tamaños del promotor de longitud completa y de la 3'-UTR de longitud completa fueron 2.006 pb y 1.000 pb, respectivamente.

Ejemplo 3: Modificaciones del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*

Secuencias de promotor y 3'- UTR

Se modificó la secuencia del promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*. Se identificaron y quitaron las secuencias repetidas, lo que dio como resultado una secuencia del promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificada de:

GCACAAAATACATAAACTAGATTAGAAAAGGAAGAGAATACGCCAAATTGCAGCTTAATC
AATTAGACGATTTAGTCCTGTTTTTACGAAACAATTGTTTAAGATAACATGGCCTTATACT

TGGAGTTTGGCATGTCTTATGCTATGTTGCAAACAGGCCCGGTCTTGACATTTCTGGGGGCC
CTAAGAGAAAATTTATATAGAGGTCCTATACGAAAATTTGAGTCTGTTATTTTTTCAACTT
TTAAATAATATATGAAAAATAAAAAATTGATGATTTACATAATTTTATTCAAATGATATG
ACTGGAAATATTGTTACAGTATTTTATGAGTCGTAAAATTATATAAATTATGTAATATACA
TTTGTTTTGACTTTTGAGAGAGTATTTTACTTTTAATTTGTCAAAGTACCTAAACCTTA
AAATACACAGTAAACCAAATCTAAATACATTAGATCAAATTTTCTGAAAATAAAGTTCAGC
AAACTAAAGTATGATTAATCAATGTAGGTTATTAGGGTCGACCCTTCGGTAGGCTAGAATT
AAGCAACGCGATAGGCACAGGTGTACAACACCTTTCTGTCCTTCCCACGTCAATAAAGTATT
TGTCATCAAGCAGACGGTTGCGCGACCTCAAAGAGATGATTGCTAGAAAATAAAGAGACGC
AACAAAAGAATGAAAATATAGATTTATCTATAACTTATATGCATTTGATATAAGATAGATA
AATGGGAGCCCTACGAACCTTGAGGCTCTGAGCAGTCGCATATCCTGCACACCCTTGCGCG
CGGCCCTGGTTGCAAATATGCAATTGTGTCTTATCCGCGACTGGTCACGAGGCTAGGATT
GATCGAAAGCTGCCGATGAGAAATGGCAAGGGCGGCATGCTGTGGCCTTTTTTTTACGGTC
TGTCAGGACAACTGAAAAGTTACAAATTTATAGTGGTTGTAAACAGCAACACGTTAAAAAG
TCGATTATCAGTTTCACAGAAAGAGGTCGTTAAAACCGCCAGCAAGCTTGTTTCACTATCA
GTCTGTCGCTAAGACAATCTCTTTCACCAAAAATACAATTTGCTTTCTTGCCGTTGCTTCA
AGTGAAAATCTGAGCTAAAAAGAGAGAGGCTGTCTGAAGAAAAATCCATAACCAACGCAA
AATCCCGGGCGCCCAATCAGCCTTCTCCGCGGAGATTCTAGCCTCAGCCAGAGCTACCTC
ATCTGCGTGAGGCTCCGGTGGCGCCAAGTGTTCCGGCATCCCGGACGCACCAATGGCATCC
GAGCAACAGATCTTTTCTGCAACAACGCTTCGCGTCGCGGCGGTGTTTCCCTCCATCTGCT
CTGCTCTTTAAATACCTCCGTCGTCTCCTCGTCTCCACAGCATCTCAAGTCTTCACACTCC
TCGCCATCACATAAAACCAGTGCAAGCAGAAGCAGCGCA (SEQ ID NO: 3)

La FIG. 2 proporciona una alineación del promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa (SEQ ID NO: 1) en comparación con el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificado (SEQ ID NO: 3); esta alineación muestra las secuencias de polinucleótidos repetidas que se quitaron para producir la secuencia del promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificada.

A continuación, se modificó la secuencia 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* (SEQ ID NO: 7). La 3'-UTR se truncó a una secuencia de polinucleótidos de 400 pb, lo que dio como resultado una secuencia modificada 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* (SEQ ID NO: 8) de:

```
GGGGGTGGAGGCGCCACCGCCCACCGGCCACCGCTGCGGATATCTAGGTGTTCGGATGCAC
GTGAGCGCGCACTGGTTCCAGTTTGTACCATGATGTAAATTACTTACCGTACCAGGGTTCA
ATCGGCAAGGAAGAATTGTTGTGTTCACTGTCTTGGGCAGTCTCTTGGTCCAATATGAATC
AACTTACACAGCATCTCCAAAACTTCTAAAATTACTAGCTGAATGCCCCGTGCGTTGCAAC
GGGAATATATAATACCAGTATACTACGATAACTTATATACAAAATGTATGTTATATCGTTA
TGAGAAAATGTTTCATAACCAATTTATGATTCTGGTCATACATAAATTTTGTATTATATAG
TCTATCTGTTTCACCACTACATTGCAACCATCAG (SEQ ID NO: 8)
```

Los elementos de ADN se amplificaron o se sintetizaron y se clonaron en vectores de entrada. Las longitudes del promotor modificado y de la 3'-UTR modificada fueron 1.442 pb y 400 pb, respectivamente.

Ejemplo 4: Construcción del promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays*

El promotor anterior del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa de la SEQ ID NO: 2 unido al intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO: 5 y una secuencia 5' UTR (SEQ ID NO: 19) dieron como resultado el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa de la SEQ ID NO: 1. La expresión de *cry34Ab1* (gen indicador de *B. thurengiensis*) se condujo mediante el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa (SEQ ID NO: 1) y se terminó mediante la 3'-UTR de *Solanum tuberosum* PinII (StPinII 3'-UTR v2; An et al., (1989) *Plant Cell* 1; 115-22). Cada uno de los elementos génicos se amplificó con cebadores que contenían una homología mínima de 15 pb superpuestas a su elemento de ADN flanqueante. Todos los fragmentos se purificaron en gel. A continuación, se ensamblaron los tres

fragmentos, junto con una estructura principal de vector de entrada, pENTR11, en un orden direccional mediante una reacción de clonación continua GENEART® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se realizó entonces una reacción GATEWAY® LR CLONASE® (Invitrogen) con el plásmido de entrada resultante y un vector de destino, lo que llevó a un vector de expresión final, pDAB114438. El vector de destino contenía un casete de marcador seleccionable compuesto por un gen de *aad-1* conducido por el promotor de ubiquitina-1 de *Zea mays* de longitud completa (Christensen *et al.*, (1992) *Plant Molecular Biology* 18; 675-689) y terminado por una 3'-UTR de la lipasa del maíz (patente estadounidense n.º 7,179,902). La construcción resultante, pDAB114438, es una construcción de expresión heteróloga que contiene un casete de expresión génica *aad-1* y una construcción de expresión génica *cry34Ab1* (FIG. 3).

En una segunda construcción, se condujo la expresión de *cry34Ab1* (gen indicador de *B. thurengiensis*) mediante el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa (SEQ ID NO: 1) y se terminó mediante la 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificada (SEQ ID NO: 8). Cada uno de los elementos génicos

se amplificó con cebadores que contenían una homología mínima de 15 pb superpuestas a su elemento de ADN flanqueante. Todos los fragmentos se purificaron en gel. A continuación, se ensamblaron los tres fragmentos, junto con una estructura principal de vector de entrada, pENTR11, en un orden direccional mediante una reacción de clonación continua GENEART® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se realizó entonces una reacción GATEWAY® LR CLONASE® (Invitrogen) con el plásmido de entrada resultante y un vector de destino, lo que llevó a un vector de expresión final, pDAB120166. El vector de destino contenía un casete de marcador seleccionable compuesto por un gen de *aad-1* conducido por el promotor de ubiquitina-1 de *Zea mays* (Christensen *et al.*, (1992) *Plant Molecular Biology* 18; 675-689) y terminado por una 3'-UTR de la lipasa del maíz (patente estadounidense n.º 7,179,902). La construcción resultante, pDAB120166, es una construcción de expresión heteróloga que contiene un casete de expresión génica *aad-1* y una construcción de expresión génica *cry34Ab1* (FIG. 7).

En una tercera construcción, se condujo la expresión de *cry34Ab1* (gen indicador de *B. thurengiensis*) mediante el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificado. El promotor anterior del gen de unión a la

clorofila a/b de *Zea mays* modificado de la SEQ ID NO: 4 unido al intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO: 5 y una secuencia 5' UTR (SEQ ID NO: 19) dieron como resultado el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificado de la SEQ ID NO: 3. La expresión de *cry34Ab1* (gen indicador de *B. thurengiensis*) se condujo mediante el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificado (SEQ ID NO: 3) y se terminó mediante la 3'-UTR de *Solanum tuberosum* PinII (StPinII 3'-UTR v2; An et al., (1989) *Plant Cell* 1; 115-22). Cada uno de los elementos génicos se amplificó con cebadores que contenían una homología mínima de 15 pb superpuestas a su elemento de ADN flanqueante. Todos los fragmentos se purificaron en gel. A continuación, se ensamblaron los tres fragmentos, junto con una estructura principal de vector de entrada, pENTR11, en un orden direccional mediante una reacción de clonación continua GENEART® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se realizó entonces una reacción GATEWAY® LR CLONASE® (Invitrogen) con el plásmido de entrada resultante y un vector de destino, lo que llevó a un vector de expresión final, pDAB120165. El vector de destino contenía un casete de marcador seleccionable compuesto por un gen de *aad-1* conducido por el promotor de ubiquitina-1 de *Zea*

mays modificado (Christensen *et al.*, (1992) *Plant Molecular Biology* 18; 675-689) y terminado por una 3'-UTR de la lipasa del maíz (patente estadounidense n.º 7,179,902). La construcción resultante, pDAB120165, es una construcción de expresión heteróloga que contiene un casete de expresión génica *aad-1* y una construcción de expresión génica *cry34Ab1* (FIG. 6).

Se ensambló una construcción de control negativo, pDAB101556, que contenía un gen indicador de proteína amarilla fluorescente (YFP; Shaginet *et al.*, (2004) *Mol Biol Evol* 21; 841-50) en vez del gen *cry34Ab1* (FIG. 4) y el mismo casete de expresión *aad-1* presente en pDAB114438. Se fabricó una construcción de control positivo, pDAB108746, compuesta por el promotor de ubiquitina-1 de *Zea mays* y la 3' UTR del gen inhibidor de la proteasa *Solanum tuberosum* II (StPinII 3'-UTR v2; An *et al.*, (1989) *Plant Cell* 1; 115-22) que controlaba la expresión del gen *cry34Ab1* (FIG. 5). El casete *aad-1* fue el mismo que el presente en pDAB114438.

Ejemplo 5: Transformación vegetal y confirmación molecular
Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*:

Los vectores de expresión binarios fueron transformados en la cepa DAt13192 de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa ternaria deficiente RecA) (publicación de patente internacional n.º W020120162222). Se seleccionaron las colonias bacterianas y el ADN plasmídico binario fue aislado y confirmado mediante la digestión de la enzima de restricción.

Inicio del cultivo de *Agrobacterium*:

Los cultivos de *Agrobacterium* se extendieron a partir de reservas de glicerol a un medio mínimo de AB (Gelvin, S., 2006, *Agrobacterium Virulence Gene Induction*, en Wang, K., ed., *Agrobacterium Protocols Second Edition Vol. 1*, Humana Press, p. 79; realizado sin sacarosa y con 5 g/L de glucosa y 15 g/L de Agar BACTO™) y se incubaron a 20 °C en la oscuridad durante 3 días. Luego, los cultivos de *Agrobacterium* se extendieron a una placa de medio YEP (Gelvin, S., 2006, *Agrobacterium Virulence Gene Induction*, en Wang, K., ed., *Agrobacterium Protocols Second Edition Vol. 1*, Humana Press, p. 79) y se incubaron a 20 °C en la oscuridad durante 1 día.

En el día de un experimento, se preparó una mezcla de medio de inoculación (2,2 g/L de sales MS, 68,4 g/L de

sacarosa, 36 g/L de glucosa, 115 mg/L de L-prolina, 2 mg/L de glicina, 100 mg/L de mioinositol, 0,05 mg/L de ácido nicotínico, 0,5 mg/L de HCl de piridoxina, 0,5 mg/L de HCl de tiamina) y acetosiringona en un volumen apropiado para el tamaño del experimento. Se agregó una solución madre 1 M de acetosiringona en sulfóxido de dimetilo al 100 % al medio de inoculación para lograr una concentración final de 200 μ M de acetosiringona.

Para cada construcción, los bucles 1-2 de *Agrobacterium* de la placa YEP fueron suspendidos en 15 ml de la mezcla de medio de inoculación/acetosiringona dentro de un tubo de centrífuga estéril y descartable de 50 ml, y se midió la densidad óptica de la solución a 600 nm (OD_{600}) en un espectrofotómetro. La suspensión fue posteriormente diluida a 0,25-0,35 OD_{600} utilizando una mezcla adicional de medio de inoculación/acetosiringona. El tubo de la suspensión de *Agrobacterium* se colocó posteriormente de forma horizontal en una plataforma agitadora ajustada a alrededor de 75 rpm a temperatura ambiente durante entre 1 y 4 horas antes de su uso.

Transformación del maíz:

Las construcciones experimentales se transformaron en maíz a través de una transformación mediada por *Agrobacterium* de embriones inmaduros aislados de la línea endogámica, *Zea mays* c.v. B104. El método utilizado es similar a los publicados por Ishida *et al.*, (1996) Nature Biotechnol 14: 745-750 y Frame *et al.*, (2006) Plant Cell Rep 25: 1024-1034, pero con varias modificaciones y mejoras para que el método sea propenso a la transformación de alto rendimiento. Un ejemplo de un método utilizado para producir una cantidad de eventos transgénicos en el maíz se proporciona en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US 2013/0157369 A1, que comienza con las etapas de infección del embrión y cocultivo.

Confirmación molecular:

Las plantas de maíz transgénico putativas se analizaron en la etapa V2-3 de la hoja en búsqueda del transgén utilizando ensayos cuantitativos de PCR de *aad-1* y *cry34Ab1*. Se extrajo el ADN total de 4 perforaciones de hoja, utilizando el kit de extracción de ADN MagAttract® (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

Para detectar los genes de interés, se amplificaron fragmentos de ADN específicos al gen con conjuntos de cebadores/sondas TaqMan® que contenían una sonda fluorescente marcada con FAM para el gen *cry34Ab1* y una sonda fluorescente marcada con HEX para el control del gen de referencia endógeno de la invertasa. Se utilizaron los siguientes cebadores para las amplificaciones del gen de referencia endógeno de la invertasa y *cry34Ab1*. Las secuencias de cebadores fueron las siguientes;

Cebadores/sondas *Cry34Ab1*:

Cebador directo: TQ.8v6.1.F: GCCATACCCTCCAGTTG (SEQ ID NO: 10)

Cebador inverso: TQ.8v6.1.R: GCCGTTGATGGAGTAGTAGATGG (SEQ ID NO: 11)

Sonda: TQ.8v6.1.MGB.P: 5' -/56-FAM/ CCGAATCCAACGGCTTCA / MGB (SEQ ID NO: 12)

Cebadores de invertasa:

Cebador directo: InvertaseF: TGGCGGACGACGACTTGT (SEQ ID NO: 13)

Cebador inverso: InvertaseR: AAAGTTTGGAGGCTGCCGT (SEQ ID NO: 14)

InvertaseProbe: 5'-/5HEX/CGAGCAGACCGCCGTGTACTT /3BHQ_1/-3'

(SEQ ID NO: 15)

A continuación, se llevaron a cabo las reacciones PCR en un volumen final de 10 µl de reacción que contenía 5 µl de Roche LightCycler® 480 Probes Master Mix (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN); 0,4 µl de cada uno de los cebadores TQ.8v6.1.F, TQ.8v6.1.R, Invertase F e InvertaseR de reservas de 10 µM a una concentración final de 400 nM; 0,4 µM de cada una de las sondas TQ.8v6.1.MGB.P e Invertasa de reservas de 5 µM a una concentración final de 200 nM, 0,1 µl de polivinilpirrolidona (PVP) al 10 % a una concentración final de 0,1 %; 2 µl de 10 ng/µl de ADN genómico y 0,5 µl de agua. El ADN se amplificó en un sistema Roche LightCycler® 480 en las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95 °C durante 10 min; 40 ciclos de las siguientes 3 etapas: 95 °C durante 10 segundos; 58 °C durante 35 segundos y 72 °C durante 1 segundo, y un ciclo final de 4 °C durante 10 segundos. El número de la copia *cry34Ab1* se determinó mediante comparación de valores objetivo (gen de interés)/Referencia (gen de la invertasa) para muestras desconocidas (resultados de LightCycler® 480) con los valores objetivo/Referencia de controles de número de copia de *cry34Ab1*.

La detección del gen *aad-1* se llevó a cabo tal como se describió anteriormente para el gen *cry34Ab1* utilizando el gen de referencia endógeno de la invertasa. Las secuencias de cebadores de *aad-1* fueron las siguientes;

Cebador directo de AAD1: TGTTTCGGTTCCTCTACCAA (SEQ ID NO: 16)

Cebador inverso de AAD1: CAACATCCATCACCTTGACTGA (SEQ ID NO: 17)

Sonda de AAD1: 5'-FAM/CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA-MGB/BHQ-3' (SEQ ID NO: 18)

Finalmente, las plantas T_0 que contenían el gen de interés se analizaron en V4-5 para *cry34Ab1* y AAD-1 mediante ensayos ELISA de hoja. Se analizaron cuatro perforaciones de hoja. Se analizó otro conjunto de plantas en V4-5 para la totalidad de la masa radicular para ambos ensayos ELISA de proteínas. Se realizaron ensayos ELISA de hoja y raíz de Cry34Ab1 (Agdia, Inc., Elkart, IN) y AAD-1 (Acadia BioScience) según las instrucciones del fabricante. Los ensayos ELISA de hoja de Cry34Ab1 se expresaron como ng/cm² o como partes por millón (ppm, o proteína ng por mg de proteína total de la planta), mientras que los resultados de ELISA de raíz se expresaron como ppm. El total de los ensayos de

proteína de la raíz se llevó a cabo con el método de detección de Bradford según las instrucciones del fabricante.

Las plantas T_0 se cruzaron a líneas de transformación no transgénicas de *Zea mays* c.v. B104 para obtener una semilla T_1 . Se hicieron avanzar tres eventos o líneas transgénicas de cada una de las construcciones del elemento regulador de la prueba para los estudios de expresión génica de ARN y proteína T_1 y luego para la producción de semillas T_2 . Por consiguiente, se sembraron 30-40 semillas T_1 de cada uno de los eventos; las plántulas se rociaron con ASSUREII® en la etapa V2-V3 del desarrollo para matar segregantes no transgénicos. Las plantas transgénicas se analizaron en múltiples etapas del desarrollo de la planta para ELISA de *cry34Ab1* y AAD-1 de la siguiente manera: hoja (V4, V12 y R3); raíz (V4 y R1); tallo (R1); polen (R1); barba (R1); cáscara (R3); grano (R3) y elote (R3). Todos los tejidos se aislaron y se colocaron en tubos incrustados en hielo seco, los cuales luego se transfirieron a -80°C . Los tejidos congelados se liofilizaron previo a la extracción de proteínas para ELISA.

Se tomaron muestras de las plantas transgénicas putativas T_1 que contenían transgenes de *cry34Ab1*, *yfp* y *aad-1* en V4-5 para los ensayos ELISA de hoja. Se analizaron

cuatro perforaciones de hoja. Las perforaciones de hoja se colocaron en un tubo y se agregó una única perla de acero inoxidable de 1/8" (Hoover Precision Products, Cumming, GA, EUA) a cada tubo de 1,2 ml que contenía 300 µl de amortiguador de extracción (1X PBST complementado con Tween 20 al 0,05 % y BSA al 0,5 %). Las muestras se procesaron en un GENOGRINDER™ (SPEX SamplePrep, Metuchen, NJ) a 1.500 rpm durante 4 minutos. Las muestras se centrifugaron a 4.000 rpm durante 2 minutos en una centrífuga Sorvall Legend XFR™. A continuación, se agregaron 300 µl adicionales de amortiguador de extracción y las muestras se procesaron una vez más en un GENOGRINDER™ a 1.500 rpm durante 2 minutos. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 4.000 rpm durante 7 minutos. Finalmente, se recolectó el sobrenadante y se completaron los ensayos ELISA a diferentes diluciones junto con los estándares de proteína, utilizando los kits de ensayo ELISA disponibles en el mercado para Cry34Ab1 (Agdia, Inc.) y AAD-1 (Acadia BioScience, LLC), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La extracción de proteínas para ELISA de varios tipos de tejido se llevó a cabo mediante la trituration del tejido liofilizado en un agitador de pintura durante 30 segundos. Para los tejidos que precisaban una

trituration adicional, se repitió la etapa de trituración durante 30 segundos más. Se añadió polvo de granate para cubrir la parte curva en el fondo del tubo. El tejido bruscamente triturado se transfirió a tubos de 2 ml y se llenó hasta la marca de 0,5 ml. Se agregó una bola de cerámica a cada tubo, así como 0,6 ml del amortiguador de extracción parcial (200 µl de cóctel inhibidor de proteasa, 200 µl de EDTA 500 mM, 15,5 mg de polvo DTT y PBST a 20 ml). Todos los tubos se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. Los tubos fríos se transfirieron al recipiente de 2 ml del GENOGRINDER®. Las mezclas se trituraron dos veces durante 30 segundos con un intervalo de enfriamiento de 5 minutos en hielo. A continuación, se agregaron a las muestras 40 µl de TWEEN®-20 al 10% y 300 µl de amortiguador de extracción. Las muestras se trituraron durante 30 segundos más con un intervalo de 5 minutos de enfriamiento. Finalmente, cada muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 7 minutos y el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo nuevo para recolectar el extracto. El extracto se volvió a suspender en el amortiguador de extracción y se diluyó según fuera necesario para los tejidos de hoja de los ensayos ELISA.

Ejemplo 6: Expresión de planta transgénica T₀

Los resultados de ELISA de Cry34Ab1 indicaron que el elemento regulador del promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) condujo una expresión preferida de la hoja de Cry34Ab1 en eventos T₀ que fueron transformados con la construcción pDAB114438. Se observó una expresión insignificante de Cry34Ab1 mediante el elemento regulador del promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa en los tejidos de raíz de estos eventos (Tablas 1 y 2). Los eventos producidos a partir de la construcción de control positivo pDAB108746 expresaron Cry34Ab1 tanto en tejidos de raíz como de hoja. No se observó ni detectó expresión de Cry34Ab1 en hoja en eventos vegetales transformados con la construcción de control negativo, pDAB101556, que no contenía el gen *cry34Ab1*. Todas las construcciones expresaron el gen *aad-1* tanto en tejidos de raíz como de hoja.

Adicionalmente, el elemento regulador del promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4) condujo la expresión de Cry34Ab1 y la expresión

de la proteína AAD-1 en hoja (V4) según se midió mediante ELISA en las plantas transgénicas T₀ (Tabla 3). Las plantas transgénicas T₀ que se transformaron con pDAB120165 representan la expresión del promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificado (SEQ ID NO: 3 y 4) junto con St. PinII 3'-UTR, mientras que las plantas transgénicas T₀ transformadas con pDAB120166 representan la expresión del promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa (SEQ ID NO: 1 y 2) en combinación con la 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificado (SEQ ID NO: 8). Estos resultados indican que las secuencias del promotor (SEQ ID NO: 1-4) y de la 3'-UTR (SEQ ID NO: 7-8) de la presente descripción son funcionales para conducir la expresión de un transgén en un casete de expresión génica dentro de eventos de plantas de maíz transgénicas T₀.

Tabla 1. Resultados de ELISA que demuestran la expresión de transgenes de *cry34Ab1* y *AAD-1* en hojas de maíz V4-V6 de varios eventos de construcciones. STD es una abreviatura de desviación estándar.

Nombre de la construcción	Cantidad de eventos	Promedio de Cry34	STD de	Promedio de AAD-1	STD de
---------------------------	---------------------	-------------------	--------	-------------------	--------

	analizados	(ng/cm²)	Cry34	(ng/cm²)	AAD-1
pDAB114438	24	134	123	165	106
pDAB108746	18	129	79	173	96
pDAB101556	2	0	0	198	129

Tabla 2. Resultados del ensayo de ELISA que demuestran la expresión de transgenes de cry34 y AAD-1 en raíces de maíz V4-V6 de varios eventos de construcciones. STD es una abreviatura de desviación estándar.

Nombre de la construcción	Cantidad de eventos analizados	Promedio de Cry34 (ppm)	STD de Cry34	Promedio de AAD-1 (ppm)	STD de AAD-1
pDAB114438	6	5	8	1196	800
pDAB108746	4	2672	2981	538	304
pDAB101556	2	0	0	1204	798

Tabla 3. La expresión de la proteína Cry34Ab1 en la hoja (V4) conducida por el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa y finalizada por la 3' -UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* para pDAB120166, y para la 3' -UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificado para pDAB120165, se

midio a travs de ELISA en las plantas transgnicas T₀.

Tambi3n se incluye la expresi3n de prote3na en hoja (V4) para AAD-1. STD es una abreviatura de desviaci3n est3ndar.

N.º de construcci3n	Cantidad de eventos T₀ analizados	Promedio de Cry34Ab1 (ng/mg)	STD de Cry34	Promediode AAD-1 (ng/mg)	STD de AAD-1
pDAB120165	34	477	184	277	299
pDAB120166	17	412	153	283	232

Ejemplo 7: Expresi3n de planta transgnica T₁

Los resultados de ELISA de Cry34 de los eventos de plantas transgnicas T₁ indicaron que el elemento regulador del promotor del gen de uni3n a la clorofila a/b de *Zea mays* (SEQ ID NO: 1) condujo la expresi3n preferida sobre el nivel del suelo, espec3ficamente en tejidos de hoja, tallo y c3scara de Cry34Ab1. Estos datos se generaron a partir de eventos T₁ que se transformaron con la construcci3n pDAB114438. Adicionalmente, se observ3 una expresi3n insignificante de Cry34Ab1 mediante el elemento regulador del promotor del gen de uni3n a la clorofila a/b de *Zea mays* (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) en los tejidos de ra3z, grano y

polen de estos eventos (Tabla 4). De manera interesante, la expresión de Cry34Ab1 en el tejido del elote presentó una expresión 10 veces menor que la expresión de Cry34Ab1 en el tejido de la barba de los eventos analizados. No se observó ni detectó expresión de Cry34Ab1 en eventos vegetales transformados con la construcción de control negativo, pDAB101556. Esta construcción pDAB101556, no contiene el transgén de *cry34Ab1*. Todas las construcciones expresaron el gen *aad-1* tanto en tejidos de raíz como de hoja.

Tabla 4. Expresión de proteínas Cry34Ab1 y AAD-1 en diferentes tipos de tejido según lo medido por ELISA en las plantas transgénicas T₁. STD es una abreviación de desviación estándar.

N.º de construcción	Tejido analizado	Total de eventos analizados	Total de muestras analizadas	Promedio de Cry34Ab1 (ng/mg)	STD de Cry34	Promedio de AAD-1 (ng/mg)	STD de AAD-1
pDAB101556	Hoja V4	1	13	1	0	497	161
pDAB114438	Hoja V4	3	43	1014	451	108	142
pDAB114438	Hoja V12	3	12	1686	705	289	124

N.º de construcción	Tejido analizado	Total de eventos analizados	Total de muestras analizadas	Promedio de Cry34Ab1 (ng/mg)	STD de Cry34	Promedio de AAD-1 (ng/mg)	STD de AAD-1
pDAB114438	Hoja R3	3	9	2454	1288	645	163
pDAB101556	Raíz V4	1	3	4	3	2722	234
pDAB114438	Raíz V4	3	9	5	7	1509	370
pDAB114438	Elote	2	10	265	223	3477	512
pDAB114438	Barba	2	5	2828	1434	3701	605
pDAB114438	Grano	2	7	24	18	2463	250
pDAB114438	Tallo	2	5	5439	2906	6807	1730
pDAB114438	Cáscara	2	10	4333	1974	1746	391
pDAB114438	Polen	2	4	72	13	1427	341

Los resultados de ELISA de Cry34Ab1 T₁ de hoja (V4) mostraron un intervalo de expresión similar de los eventos transgénicos pDAB120166 y pDAB114438 que contenían el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa (SEQ ID NO: 1 y 2) con 3'-UTR diferentes como elementos reguladores para el gen *cry34ab1*. La primera construcción, pDAB120166, contenía una 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificada (SEQ ID NO:

8) derivada del mismo gen que el promotor, mientras que la segunda construcción, pDAB114438, contenía una St PinII 3'-UTR. La hoja T₁ (V4) de Cry34Ab1 (Tabla 5). Se incluyeron también en los resultados de ELISA de Cry34Ab1 T₁ de tejido de hoja (V4) los eventos transgénicos pDAB120165 que contenían el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificado (SEQ ID NO: 3 y 4) con St PinII 3'-UTR como elementos reguladores para el gen *cry34ab1*. Los resultados de ELISA de los eventos transgénicos pDAB120165 presentaron aproximadamente 50 % - 60 % menos de expresión en comparación con pDAB120166 o pDAB114438 que contenían el promotor del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa (SEQ ID NO: 1 y 2). La construcción pDAB120165 contenía un promotor modificado (SEQ ID NO: 3 y 4) y PinII 3'-UTR. Estos resultados indican que las secuencias del promotor (SEQ ID NO: 1-4) y de la 3'-UTR (SEQ ID NO: 7-8) de la presente descripción son funcionales para conducir la expresión de un transgén en un casete de expresión génica dentro de eventos de plantas de maíz transgénicas T₁.

Tabla 5. Expresión de proteínas Cry34Ab1 y AAD-1 en la hoja (V4) según lo medido por ELISA en las plantas

transgénicas T₁ de las diferentes construcciones. STD es una abreviatura de desviación estándar.

N.º de construcción	Eventos analizados	Muestras analizadas	Promedio de Cry34Ab1 (ng/mg)	STD	Promedio de AAD-1 (ng/mg)	STD
Control no transgénico	NA	3	0	NA	0	NA
pDAB120166	5	43	738	103	94	49
pDAB114438	3	30	896	439	65	53
pDAB120165	5	32	464	75	99	69

NA = No aplica

Como tal, se identificaron y caracterizaron los elementos reguladores novedosos del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* que incluyen: los promotores del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, los promotores del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificados de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4; el intrón del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO: 5; la 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de la

SEQ ID NO: 19; la 5'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de la SEQ ID NO: 19; la 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* de longitud completa de la SEQ ID NO: 7; la 3'-UTR del gen de unión a la clorofila a/b de *Zea mays* modificada de la SEQ ID NO: 8. Se describen por primera vez elementos reguladores promotores novedosos para su uso en construcciones de expresión génica.