

EXPRESIÓN ESPECÍFICA DE RAÍZ CONFERIDA POR ELEMENTOS REGULATORIOS DE GEN QUIMÉRICO

CAMPO DE ESTA INVENCION

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

ANTECEDENTES

Muchas especies de plantas pueden ser transformadas con transgenes para introducir rasgos o características deseables desde el punto de vista agronómico. Las especies de plantas se desarrollan y/o modifican para que tengan rasgos deseables particulares. En general, los rasgos deseables incluyen, por ejemplo, mejorar la calidad del valor nutricional, lograr mayor rendimiento, conferir resistencia a plagas o enfermedades, aumentar la tolerancia a la sequía y al estrés, mejorar las cualidades hortícolas (por ejemplo, pigmentación y crecimiento), impartir resistencia a los herbicidas, permitir la producción de compuestos y/o materiales útiles para la industria a partir de la planta, y/o permitir la producción de agentes farmacéuticos.

Las especies de plantas transgénicas que comprenden múltiples transgenes apilados en un único locus genómico se producen a través de tecnologías de transformación de plantas. Las tecnologías de transformación de plantas dan por resultado la introducción de un transgen en una célula de planta, la recuperación de una planta transgénica fértil que contiene la copia establemente integrada del transgen en el genoma de la planta, y la subsiguiente expresión del transgen a través de la transcripción y traducción del genoma de la planta, que resulta en plantas transgénicas que poseen rasgos y fenotipos deseables. Sin embargo, se desean mecanismos que permitan la producción de especies de plantas transgénicas para expresar altamente múltiples transgenes diseñados como un apilamiento de rasgos.

De igual modo, se desean mecanismos que permitan la expresión de un transgen dentro de tejidos u órganos particulares de una planta. Por ejemplo, se puede lograr un

aumento de la resistencia de una planta a la infección por parte de patógenos del suelo transformando el genoma de la planta con un gen de resistencia al patógeno, de modo tal que la proteína de resistencia al patógeno esté robustamente expresada dentro de las raíces de la planta. Alternativamente, se puede desear expresar un transgen en tejidos de planta que se encuentran en una fase de crecimiento o desarrollo particular, tal como, por ejemplo, división celular o elongación.

En la presente se describen elementos regulatorios promotores quiméricos (por ejemplo, secuencias de promotores que comprenden promotores corriente arriba, intrones y 5'-UTR). Además, se describen constructos y métodos que utilizan elementos regulatorios promotores quiméricos.

SÍNTESIS

En la presente se divulgan constructos y métodos para expresar un transgen en células de planta y/o tejidos de planta. En una forma de realización, un constructo incluye un casete de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos quimérica que comprende una secuencia de polinucleótidos promotora corriente arriba que fue obtenida de peroxidasa 5 de *Zea mays* y seguida por alcohol deshidrogenasa (I) de *Zea mays* intrón 6 y 5'-UTR del virus de la veta del maíz. La secuencia del promotor quimérico resultante comprende un nuevo elemento regulatorio génico quimérico.

En una forma de realización, un casete de expresión génica incluye un elemento regulatorio promotor génico quimérico unido operativamente a un transgen o una secuencia codificadora heteróloga. En una forma de realización, un casete de expresión génica incluye al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más transgenes.

En la presente se divulgan métodos para cultivar plantas que expresan un transgen usando un elemento regulatorio promotor génico quimérico (por ejemplo, promotor corriente arriba, intrón y 5'-UTR). En la presente también se divulgan métodos para cultivar tejidos y células de planta que expresan un transgen usando el elemento

regulatorio promotor génico quimérico. En una forma de realización, los métodos divulgados en la presente incluyen la expresión génica específica de tejidos en raíces de plantas. También se divulgan en la presente métodos para aislar una secuencia de polinucleótidos que comprende el elemento regulatorio promotor génico quimérico.

En una forma de realización, la presente divulgación se refiere a un casete de expresión génica que comprende un promotor unido operativamente a un transgen, en donde el promotor comprende un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas a una sonda de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con un complemento de SEC. ID NRO.:1. En un aspecto subsiguiente de la forma de realización, el polinucleótido tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEC. ID NRO.:1. En otros aspectos, el transgen operativamente unido codifica un polipéptido o un ARN pequeño. En incluso otros aspectos, el transgen se selecciona del grupo que consiste en un transgen de resistencia a insecticidas, un transgen de tolerancia a herbicidas, un transgen de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgen de eficiencia en el uso de agua, un transgen de calidad nutricional, un transgen de unión a ADN y un transgen de marcador seleccionable. En un aspecto, la forma de realización se refiere a un casete de expresión génica que comprende una 3'-región no traducida. En una forma de realización, la presente divulgación se refiere a un vector recombinante que comprende el casete de expresión génica. En un aspecto de la forma de realización, el vector se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial bacteriano, un virus y un bacteriófago. En otras formas de realización, la presente divulgación se refiere a una célula transgénica que comprende el casete de expresión génica. En otra forma de realización, la célula transgénica es una célula transgénica de planta. En una forma de realización adicional, la presente divulgación se refiere a una planta transgénica que comprende la célula de planta transgénica. En un aspecto de la forma de realización, la planta transgénica es una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea. En otros aspectos, 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 forma de realización adicional, la divulgación se refiere a una semilla

transgénica de la planta transgénica. En otra forma de realización, el promotor es un promotor preferido para el tejido. En una forma de realización subsiguiente, el promotor preferido para el tejido es un promotor preferido para el tejido de raíz.

En una forma de realización, la presente divulgación se refiere a una célula transgénica que comprende un polinucleótido sintético que hibrida en condiciones rigurosas a una sonda de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con un complemento de SEC. ID NRO.:1. En un aspecto de la forma de realización, el polinucleótido tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEC. ID NRO.:1. En un aspecto adicional de la forma de realización, la célula transgénica es una célula transgénica de planta. En otro aspecto, la célula de planta transgénica es producida mediante un método de transformación de plantas. En otros aspectos, el método de transformación de plantas se selecciona del grupo que consiste en un método de transformación mediado 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 liposoma. En una forma de realización adicional, la presente divulgación se refiere a una planta transgénica que comprende la célula de planta transgénica. En un aspecto de la forma de realización, la planta transgénica es una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea. En otros aspectos, la planta monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una planta de maíz, una planta de arroz y una planta de trigo. En formas de realización adicionales, la presente divulgación se refiere a una semilla transgénica de la planta transgénica. En una forma de realización adicional, el promotor es un promotor preferido para el tejido. En formas de realización adicionales, el promotor preferido para el tejido es un promotor preferido para el tejido de raíz.

En una forma de realización, la presente divulgación se refiere a una secuencia de polinucleótidos quimérica que hibrida en condiciones rigurosas a una sonda de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con un complemento de SEC. ID NRO.:1. En otro aspecto de la forma de realización, el polinucleótido tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEC. ID NRO.:1. En

un aspecto adicional, la secuencia de polinucleótidos quimérica está unida operativamente a un transgen. En otro aspecto, el transgen operativamente unido codifica un polipéptido o ARN pequeño. En un aspecto, la secuencia de polinucleótidos quimérica está unida operativamente al transgen. En aspectos adicionales, el transgen se selecciona del grupo que consiste en un transgen de resistencia a insecticidas, un transgen de tolerancia a herbicidas, un transgen de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgen de eficiencia en el uso de agua, un transgen de calidad nutricional, un transgen de unión a ADN y un transgen de marcador seleccionable. En una forma de realización adicional, la presente divulgación se refiere a un vector recombinante que comprende el casete de expresión génica. Otros aspectos incluyen aquellos en donde el vector se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial bacteriano, un virus y un bacteriófago. En una forma de realización, la presente divulgación se refiere a una célula transgénica que comprende el casete de expresión génica. En otros aspectos, la célula transgénica es una célula transgénica de planta. En una forma de realización, la presente divulgación se refiere a una planta transgénica que comprende la célula de planta transgénica. Un aspecto adicional incluye aquel en el cual la planta transgénica es una planta monocotiledónea. Otros aspectos incluyen aquellos en los cuales 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 forma de realización, la presente divulgación se refiere a una semilla transgénica de la planta transgénica. En un aspecto adicional de la forma de realización, la secuencia de polinucleótidos quimérica promueve la expresión preferida para la raíz de un transgen.

En una forma de realización, la presente divulgación se refiere a un método para expresar una secuencia codificadora heteróloga en una planta transgénica, donde el método comprende:

transformar una célula de planta con un casete de expresión génica que comprende una secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con SEC. ID NRO.:1 unida operativamente a la secuencia codificadora heteróloga, que está unida operativamente a una 3'- región no traducida;

aislar la célula de planta transformada que comprende el casete de expresión génica;
 regenerar la célula de planta transformada en una planta transgénica; y,
 obtener la planta transgénica, en donde la planta transgénica comprende el casete de expresión génica que comprende la secuencia de polinucleótidos que comprende SEC. ID NRO.:1.

En un aspecto de la forma de realización, la secuencia codificadora heteróloga se selecciona del grupo que consiste en una secuencia codificadora de resistencia a insecticidas, una secuencia codificadora de tolerancia a herbicidas, una secuencia codificadora de eficiencia en el uso de nitrógeno, una secuencia codificadora de eficiencia en el uso de agua, una secuencia codificadora de calidad nutricional, una secuencia codificadora de unión a ADN y una secuencia codificadora de marcador seleccionable. En otros aspectos, la transformación de una célula de planta es un método de transformación de plantas. En aspectos subsiguientes, el método de transformación de plantas se selecciona del grupo que consiste en un método de transformación mediado 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 liposoma. En otros aspectos, la planta transgénica es una planta transgénica monocotiledónea o dicotiledónea. Otros aspectos incluyen aquellos en donde la planta transgénica monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una planta de maíz, una planta de trigo y una planta de arroz. En una forma de realización, la presente divulgación se refiere a una semilla transgénica de la planta transgénica. En aspectos adicionales, la secuencia codificadora heteróloga se expresa en un tejido de planta transgénica. En aspectos subsiguientes, el tejido de planta transgénica es un tejido de raíz de planta transgénica.

En una forma de realización, la presente divulgación se refiere a un método para aislar una secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con SEC. ID NRO.:1, en donde el método comprende:
 identificar la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con SEC. ID NRO.:1;

producir una pluralidad de secuencias de cebador de oligonucleótido, en donde las secuencias de cebador de oligonucleótido se unen con la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con SEC. ID NRO.:1; amplificar la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con SEC. ID NRO.:1 a partir de una muestra de ADN con secuencias de cebador de oligonucleótido seleccionadas de la pluralidad de secuencias de cebador de oligonucleótido; y, aislar la secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con SEC. ID NRO.:1.

En otro aspecto de la forma de realización, la secuencia de polinucleótidos aislada que comprende una identidad de secuencia de al menos 90% con SEC. ID NRO.:1 está unida operativamente a un transgen. En un aspecto subsiguiente de la forma de realización, el transgen operativamente unido codifica un polipéptido o un ARN pequeño.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

Según se usa en la presente, los artículos “un”, “una”, “el” y “la” incluyen las referencias plurales, a menos que el contexto dicte lo contrario en forma clara y no ambigua.

Según se usa en la presente, el término “retrocruzamiento” se refiere a un proceso en el cual un criador cruza la progenie híbrida hacia atrás a uno de los progenitores, por ejemplo, un híbrido de primera generación F1 con uno de los genotipos parentales del híbrido F1.

Según 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 es transcrita pero no traducida. Los intrones incluyen una secuencia de ácido nucleico no traducida dentro de una secuencia de ADN expresada, así como una correspondiente secuencia en moléculas de ARN transcritas desde allí.

Un constructo descrito en la presente también puede contener secuencias que mejoran la traducción y/o estabilidad de ARNm, tales como intrones. Un ejemplo de dichos intrones es el primer intrón del gen II de la variante histona de *Arabidopsis thaliana* o cualquier otra secuencia de intrones conocida comúnmente. Los intrones se pueden usar en combinación con una secuencia de promotor para mejorar la traducción y/o la estabilidad de ARNm.

Según se usa en la presente, los términos “5’ región no traducida” o “5’-UTR” se refieren a un segmento no traducido en el término 5’ de pre-ARNm o ARNm maduros. Por ejemplo, en ARNm maduros, una 5’-UTR típicamente alberga en su extremo 5’ una tapa de 7-metilguanosina y está involucrada en muchos procesos, tales como empalme, poliadenilación, exportación de ARNm hacia el citoplasma, identificación del extremo 5’ del ARNm por la maquinaria de traducción y protección de los ARNm contra la degradación.

Según se usa en la presente, el término “3’ región no traducida” o “3’-UTR” se refiere a un segmento no traducido en un término 3’ de los pre-ARNm o ARNm maduros. Por ejemplo, en ARNm maduros, esta región alberga la cola poli-(A), y se sabe que juega muchos roles en la estabilidad del ARNm, el inicio de la traducción y la exportación de ARNm.

Según se usa en la presente, el término “señal de poliadenilación” se refiere a una secuencia de ácido nucleico presente en transcritos de ARNm que permite que la terminación de transcritos, en presencia de una poli-(A) polimerasa, sea poliadenilada en el sitio de poliadenilación, por ejemplo, ubicado de 10 a 30 bases corriente abajo de la señal de poli-(A). Se conocen muchas señales de poliadenilación en el arte y son útiles para la presente invención. Una secuencia de ejemplo incluye AAUAAA y variantes de ella, como se describe en Loke J., *et al.*, (2005) *Plant Physiology* 138(3); 1457–1468.

Según se usa en la presente, el término “aislado” se refiere a un componente biológico (incluido un ácido nucleico o proteína) que se ha separado de otros

componentes biológicos en la célula del organismo en el cual se encuentra naturalmente el componente (es decir, otro ADN cromosómico y extra-cromosómico).

Según se usa en la presente, el término “purificada” en referencia a moléculas de ácido nucleico no requiere absoluta pureza (tal como una preparación homogénea); en cambio, representa una indicación de que la secuencia es relativamente más pura que en su entorno celular nativo (en comparación con el nivel natural, este nivel debe al menos 2–5 veces mayor, por ejemplo, en términos de concentración o niveles de expresión génica). Las moléculas de ADN son obtenidas directamente del ADN total o del ARN total. Además, los clones de ADNc no existen naturalmente, sino que en cambio se obtienen preferentemente a través de la manipulación de una sustancia 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 por selección clonal de las células que portan la biblioteca de ADNc. De esta forma, el proceso que incluye la construcción de una biblioteca de ADNc a partir de ARNm y la purificación de diferentes clones de ADNc proporciona una purificación de aproximadamente 10^6 veces del mensaje nativo. De igual manera, una secuencia de ADN promotor podría clonarse en un plásmido. Dicho clon no existe naturalmente, sino que de preferencia se obtiene a través de la manipulación de una sustancia natural parcialmente purificada, tal como una biblioteca de ADN genómico. Por lo tanto, en estas técnicas se favorece la purificación de al menos un orden de magnitud, preferentemente dos o tres órdenes, y más preferentemente cuatro o cinco órdenes de magnitud.

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

células de plantas), así como moléculas de ácido nucleico, proteínas y péptidos sintetizados químicamente.

El término “recombinante” significa una célula u organismo en el cual se ha producido una recombinación genética. También incluye una molécula (por ejemplo, un vector, plásmido, ácido nucleico, polipéptido o ARN pequeño) que ha sido alterado en forma artificial o sintética (es decir, no natural) mediante la intervención humana. La alteración se puede realizar en la molécula dentro de su entorno o estado natural, o fuera de éste.

Según se usa en la presente, el término “expresión” se refiere al proceso mediante el cual un polinucleótido se transcribe en ARNm (incluidas moléculas de ARN pequeño) y/o el proceso mediante el cual el ARNm transcrito (también denominado “transcripto”) es posteriormente traducido en péptidos, polipéptidos o proteínas. La expresión génica puede verse influenciada por señales externas, por ejemplo, la exposición de una célula, tejido u organismo a un agente que aumenta o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen también puede ser regulada en cualquier otro lado de la vía desde el ADN al ARN a la proteína. La regulación de la expresión génica se produce, por ejemplo, a través de controles que actúan sobre la transcripción, la traducción, el transporte y procesamiento de ARN, la degradación de moléculas intermediarias tales como ARNm, o a través de la activación, inactivación, compartimentalización o degradación de moléculas de proteína específicas después de que se han constituido, o por combinaciones de ellas. La expresión génica se puede medir en el nivel de ARN o el nivel de proteína mediante cualquier método conocido en el arte, lo que incluye, sin limitaciones, Northern blot, RT-PCR, Western blot, o ensayos de actividad de proteínas *in vitro*, *in situ* o *in vivo*.

Según se usa en la presente, los términos “silenciación génica basada en homología” o “HBGS” son términos genéricos que incluyen tanto la silenciación génica transcripcional como la silenciación génica post-transcripcional. La silenciación de un locus blanco por un locus silenciador no ligado puede resultar de la inhibición de la transcripción (silenciación génica transcripcional; TGS) o la degradación de ARNm

(silenciación génica post-transcripcional; PTGS), debido a la producción de ARN de doble cadena (ARNds) correspondiente a secuencias de promotor o transcritas, respectivamente. La participación de distintos componentes celulares en cada proceso sugiere que la TGS y la PTGS inducidas por ARNds probablemente resultan de la diversificación de un antiguo mecanismo común. Sin embargo, ha resultado difícil realizar una comparación estricta de TGS y PTGS porque generalmente se basa en el análisis de distintos loci silenciadores. Se puede describir que un solo locus de transgen desencadena TGS y PTGS, debido a la producción de ARNds correspondiente a las secuencias de promotor y transcritas de diferentes genes blanco.

Según se usa en la presente, los términos “molécula de ácido nucleico”, “ácido nucleico” o “polinucleótido” (los tres términos son sinónimos entre sí) se refieren a una forma polimérica de nucleótidos, que puede incluir cadenas tanto sentido como anti-sentido de ARN, ADNc, ADN genómico y formas sintéticas, y polímeros mixtos de ellos. Un “nucleótido” se puede referir a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o a una forma modificada de cualquiera de estos tipos de nucleótidos. A menos que se especifique lo contrario, una molécula de ácido nucleico generalmente tiene al menos 10 bases de longitud. Los términos se pueden referir a una molécula de ARN o ADN de longitud indeterminada. Los términos incluyen formas de cadena simple y doble de ADN. Una molécula de ácido nucleico puede incluir cualquiera o ambos de nucleótidos naturales y modificados unidos entre sí a través de enlaces de nucleótidos naturales y/o no naturales.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden modificar en forma química o bioquímica, o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivadas, como podrá apreciar fácilmente el especialista en el arte. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, sustitución de uno o varios de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótidos (por ejemplo, enlaces no cargados: por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.; enlaces cargados: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.; restos pendientes: por ejemplo, péptidos; intercaladores: por ejemplo, acridina, psoralén, 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 de cadena simple, cadena doble, dúplex parcial, tríplex, en horquilla, circular y en candado.

La transcripción procede de 5' a 3' a lo largo de la cadena de ADN. Esto significa que el ARN está hecho por adición secuencial de ribonucleótidos 5'-trifosfatos al término 3' de la cadena creciente (con el requisito de eliminación del pirofosfato). En una molécula de ácido nucleico ya sea lineal o circular, los elementos discretos (por ejemplo, secuencias de nucleótidos particulares) se pueden denominar como “corriente arriba” respecto de otro elemento si están unidos o estarían unidos al mismo ácido nucleico en la dirección 5' desde dicho elemento. De manera similar, los elementos discretos pueden estar “corriente abajo” respecto de otro elemento si están o estarían unidos al mismo ácido nucleico en la dirección 3' desde dicho elemento.

Según se usa en la presente, el término “posición de 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 por alineación con un ácido nucleico de referencia.

Según se usa en la presente, el término “hibridación” se refiere a un proceso en el cual los oligonucleótidos y sus análogos hibridan por enlace de hidrógeno, lo cual incluye enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso, entre bases complementarias. En general, las moléculas de ácido nucleico consisten en bases nitrogenosas que son pirimidinas (citosina (C), uracilo (U) y timina (T)) o purinas (adenina (A) y guanina (G)). Estas bases nitrogenosas forman enlaces de hidrógeno entre una pirimidina y una purina, y el enlace de una pirimidina con una purina se denomina “apareamiento de bases”. Más específicamente, A se enlaza con hidrógeno a T o U, y G se enlaza a C. “Complementario” se refiere al apareamiento de bases que se produce entre dos secuencias de ácido nucleico distintas o dos regiones distintas de la misma secuencia de ácido nucleico.

Según se usa en la presente, los términos “específicamente hibridable” y “específicamente complementario” se refieren a un grado suficiente de complementariedad de modo tal que se produzca un enlace estable y específico entre un oligonucleótido y el

blanco de ADN o ARN. Los oligonucleótidos no necesitan ser 100% complementarios a la secuencia blanco para hibridar específicamente. Un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido con la molécula de ADN o ARN blanco interfiere con la función normal del ADN o ARN blanco, y existe un suficiente grado de complementariedad para evitar la unión no específica de un oligonucleótido a secuencias no blanco en condiciones en las cuales se desea una 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 por resultado un grado particular de rigurosidad variarán en función de la naturaleza del método de hibridación seleccionado y la composición y la longitud de las secuencias de ácido nucleico hibridantes. En general, la temperatura de hibridación y la potencia iónica (especialmente, la concentración de Na^+ y/o Mg^{2+}) de un búfer de hibridación contribuirán a la rigurosidad de la hibridación, aunque los tiempos de lavado también ejercen influencia sobre la rigurosidad. Los cálculos respecto de las condiciones de hibridación requeridas para lograr grados particulares de rigurosidad se discuten en Sambrook *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

Según se usa en la presente, el término “condiciones rigurosas” abarca condiciones en las cuales sólo puede ocurrir la hibridación si hay menos del 50% de discordancia entre la molécula de hibridación y el blanco de ADN. Las “condiciones rigurosas” incluyen otros niveles particulares de rigurosidad. De esta forma, según se usa en la presente, las condiciones de “rigurosidad moderada” son aquellas en las cuales las moléculas con más del 50% de discordancia de secuencia no hibridarán; las condiciones de “rigurosidad alta” son aquellas en las cuales las secuencias con más del 20% de discordancia no hibridarán; y las condiciones de “rigurosidad muy alta” son aquellas en las cuales las secuencias con más del 10% de discordancia no hibridarán.

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

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

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

Según se usa en la presente, el término “oligonucleótido” se refiere a un polímero de ácido nucleico corto. Los oligonucleótidos se pueden formar por escisión de segmentos de ácido nucleico más largos, o por polimerización de precursores de nucleótidos individuales. Los sintetizadores automáticos permiten la síntesis de oligonucleótidos 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 de ADN (oligodesoxirribonucleótidos) se pueden usar en reacciones en cadena de polimerasa, una técnica para amplificar secuencias de ADN pequeño. En una reacción en cadena de polimerasa, el oligonucleótido generalmente se denomina “cebador”, el cual permite que una polimerasa de ADN extienda el oligonucleótido y replique la cadena complementaria.

Según se usa en la presente, los términos “reacción en cadena de polimerasa” o “PCR” se refieren a un procedimiento o una técnica en la cual minúsculas cantidades de ácido nucleico, ARN y/o ADN son amplificadas como se describe en la Patente de

EE.UU. Nro. 4.683.195. En general, se debe disponer de información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá de ella, de modo que se puedan designar cebadores oligonucleótidos; estos cebadores serán idénticos o similares en cuando a secuencia respecto de los extremos opuestos de la plantilla a amplificar. Los nucleótidos del término 5' de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del materia amplificado. La PCR se puede usar para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas del ADN genómico total, y ADNc transcrito del ARN celular total, secuencias de bacteriófagos o plásmidos, etc. Véase en general Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263 (1987); Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989).

Según se usa en la presente, el término “cebador” se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis a lo largo de una cadena complementaria cuando las condiciones son adecuadas para la síntesis de un producto de extensión de cebador. Las condiciones para la síntesis incluyen la presencia de cuatro trifosfatos de desoxirribonucleótidos diferentes y al menos un agente inductor de polimerización tal como transcriptasa inversa o polimerasa de ADN. Éstos están presentes en un búfer adecuado, que puede incluir constituyentes que son cofactores o que afectan condiciones tales como el pH y similares a diversas temperaturas adecuadas. Un cebador preferentemente es una secuencia de cadena simple, de modo tal de optimizar la eficiencia de la amplificación, pero se pueden utilizar secuencias de cadena doble.

Según se usa en la presente, el término “sonda” se refiere a una secuencia de oligonucleótidos o polinucleótidos que hibrida a una secuencia blanco. En el procedimiento de ensayo TaqMan[®] o tipo TaqMan[®], la sonda hibrida a una porción del blanco situado entre el sitio de recocido de los dos cebadores. Una sonda incluye aproximadamente ocho nucleótidos, aproximadamente diez nucleótidos, aproximadamente quince nucleótidos, aproximadamente veinte nucleótidos, aproximadamente treinta nucleótidos, aproximadamente cuarenta nucleótidos o

aproximadamente cincuenta nucleótidos. En algunas formas de realización, una sonda incluye de aproximadamente ocho nucleótidos a aproximadamente quince nucleótidos.

En el procedimiento de ensayo Southern blot, la sonda hibrida a un fragmento de ADN que está unido a una membrana. Una sonda incluye aproximadamente diez nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 250 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 1.000 nucleótidos, aproximadamente 2.500 nucleótidos o aproximadamente 5.000 nucleótidos. En algunas formas de realización, una sonda incluye de aproximadamente 500 nucleótidos a aproximadamente 2.500 nucleótidos.

Una sonda puede incluir además una etiqueta detectable, por ejemplo, una etiqueta radioactiva, una etiqueta biotinilada, un fluoróforo (Texas-Red[®], isotiocianato de fluoresceína, etc.). La etiqueta detectable se puede unir en forma covalente directamente al oligonucleótido 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 un extintor, por ejemplo, Black Hole Quencher[™], Iowa Black[™], etc.

Según se usa en la presente, los términos “identidad de secuencia” o “identidad” se pueden emplear de manera indistinta y se refieren a residuos de ácidos nucleicos en dos secuencias que son la misma cuando se alinean para una máxima correspondencia en una ventana de comparación especificada.

Según se usa en la presente, el término “porcentaje de identidad de secuencia” se refiere a un valor determinado por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos) en una ventana de comparación, en donde la porción de una secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, brechas) en comparación con una secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una óptima alineación de ambas secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales un residuo de ácido nucleico o aminoácido idéntico ocurre en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de

comparación, y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Los métodos para alinear secuencias para su comparación son bien conocidos. Se describen distintos programas y algoritmos de alineación en, por ejemplo: Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444; Higgins y Sharp (1988) *Gene* 73:237–44; Higgins y Sharp (1989) *CABIOS* 5:151–3; Corpet *et 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.

La Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básica (*Basic Local Alignment Search Tool*) del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI) (BLAST™; Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403–10) está disponible en varias fuentes, que incluyen el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (Bethesda, MD), y en internet, para usar en conexión con varios programas de análisis de secuencias. Hay disponible una descripción sobre cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa en internet en la sección “ayuda” de BLAST™. Para comparar secuencias de ácido nucleico, se puede emplear la función “Blast 2 sequences” del programa BLAST™ (Blastn) usando los parámetros por defecto. Las secuencias de ácido nucleico con similitud aún mayor con las secuencias de referencia mostrarán porcentajes de identidad crecientes cuando se evalúen mediante este método.

Según se usa en la presente, el término “operativamente unido” se refiere a un ácido nucleico colocado en relación funcional con otro ácido nucleico. En general, “operativamente unido” puede significar que los ácidos nucleicos unidos son contiguos. La unión se puede lograr por enlace en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, se ligan o funden adaptadores o ligadores de oligonucleótidos sintéticos al ácido nucleico y se usan para unir el fragmento de polinucleótido contiguo. Sin embargo, los elementos no necesitan ser contiguos para estar operativamente unidos.

Según se usa en la presente, el término “promotor” se refiere a una región de ADN que generalmente está ubicada corriente arriba (hacia la región 5’ de un gen) de un gen y se necesita para iniciar e impulsar la transcripción del gen. Un promotor puede permitir la adecuada activación o represión de un gen que controla. Un promotor puede contener secuencias específicas que son reconocidas por factores de transcripción. Estos factores se pueden unir a una secuencia de ADN promotora, lo que resulta en el reclutamiento de polimerasa de ARN, una enzima que sintetiza el ARN desde la región codificadora del gene. El promotor generalmente se relaciona con todos los elementos regulatorios del gen ubicados corriente arriba respecto del gen, incluidos promotores corriente arriba, 5’-UTR, intrones y secuencias líder.

Según se usa en la presente, el término “promotor corriente arriba” se refiere a una secuencia de polinucleótidos contigua que es suficiente para el inicio directo de la transcripción. Según se usa en la presente, un promotor corriente arriba abarca el sitio de iniciación de la transcripción con varios motivos de secuencia, que incluyen TATA Box, secuencia iniciadora, elementos de reconocimiento de TFIIB y otros motivos de promotor (Jennifer, E.F. *et al*, (2002) *Genes & Dev.*, 16: 2583–2592). El promotor corriente arriba proporciona el sitio de acción a la polimerasa II del ARN, que es una enzima multi-subunidades con los factores de transcripción basales o generales como TFIIA, B, D, E, F y H. Estos factores se ensamblan en un complejo de transcripción pre-iniciación que cataliza la síntesis de ARN a partir de una plantilla de ADN.

La activación del promotor corriente arriba se realiza a través de la secuencia adicional de elementos regulatorios de secuencia de ADN a los cuales diversas proteínas se unen y posteriormente interactúan con el complejo de iniciación de la transcripción para activar la expresión génica. Estas secuencias de elementos regulatorios génicos interactúan con factores de unión a ADN específicos. Estos motivos de secuencia a veces se pueden denominar elementos *cis*. Dichos elementos *cis*, a los cuales se unen factores de transcripción específicos de tejidos o específicos del desarrollo, en forma individual o en combinación, pueden determinar el patrón de expresión espacio-temporal de un promotor en el nivel transcripcional. Estos elementos *cis* varían ampliamente en cuanto al tipo de

control que ejercen sobre genes operativamente unidos. Algunos elementos actúan para aumentar la transcripción de genes operativamente unidos en respuesta a respuestas ambientales (por ejemplo, temperatura, humedad y lesiones). Otros elementos *cis* pueden responder a señales de desarrollo (por ejemplo, germinación, maduración de semillas y floración) o a información espacial (por ejemplo, especificidad de tejido). Véase, por ejemplo, Langridge *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3219–23. Estos elementos *cis* se ubican a una distancia variable del punto de inicio de la transcripción; algunos elementos *cis* (llamados elementos proximales) son adyacentes a una región promotora central mínima, mientras que otros elementos se pueden posicionar varias kilobases corriente arriba o corriente abajo del promotor (mejoradores).

Un "transgen de unión a ADN" es una secuencia codificadora 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 se puede unir, por ejemplo, a una molécula de ADN (una proteína de unión a ADN), una molécula de ARN (una proteína de unión a ARN) 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 se puede unir a una o varias 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 de dedos de zinc tienen actividad de unión a ADN, unión a ARN y unión a proteínas.

Los ejemplos de proteínas de unión a ADN incluyen; meganucleasas, dedos de zinc, CRISPR y dominios de unión a TALE que pueden ser “modificados por ingeniería genética” para unirse a una secuencia de nucleótidos predeterminada. Típicamente, las proteínas de unión a ADN modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, dedos de zinc, CRISPR o TALE) son proteínas que no son de ocurrencia natural. Los ejemplos no limitativos de métodos para modificar proteínas de unión a ADN son diseño y selección. Una proteína de unión a ADN diseñada es una proteína que no ocurre en la naturaleza, cuyo diseño/ composición resulta principalmente de criterios racionales. Los criterios racionales para el diseño incluyen la aplicación de reglas de sustitución y algoritmos

computarizados para procesar información en una base de datos que almacena información sobre diseños de ZFP, CRISPR y/o TALE existentes y datos de unión. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 6.140.081, 6.453.242 y 6.534.261; véase también WO 98/53058, WO 98/53059, WO 98/53060, WO 02/016536 y WO 03/016496 y las Publicaciones de EE.UU. Nros. 20110301073, 20110239315 y 20119145940.

Una "proteína de unión a ADN con dedos de zinc" (o dominio de unión) es una proteína, o un dominio dentro de una proteína mayor, que une el ADN de manera específica de secuencia a través de uno o varios dedos de zinc, que son regiones de secuencias de aminoácidos dentro del dominio de unión cuya estructura se estabiliza a través de la coordinación de un ión de zinc. El término "proteína de unión a ADN con dedos de zinc" se suele abreviar como proteína con dedos de zinc, o ZFP. Los dominios de unión con dedos de zinc se pueden "modificar por ingeniería genética" para unirse a una secuencia de nucleótidos predeterminada. Los ejemplos no limitativos de métodos para modificar proteínas con dedos de zinc son diseño y selección. Una proteína con dedos de zinc diseñada es una proteína que no ocurre en la naturaleza, cuyo diseño/composición resulta principalmente de criterios racionales. Los criterios racionales para el diseño incluyen la aplicación de reglas de sustitución y algoritmos computarizados para procesar información en una base de datos que almacena información sobre diseños de ZFP existentes y datos de unión. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 6.140.081, 6.453.242, 6.534.261 y 6.794.136; véase 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 varias de las nucleasas comprende un dominio de unión a ADN efector TAL de ocurrencia natural o modificado por ingeniería genética (no natural). Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. Nro. 20110301073, incorporada a la presente por referencia en su totalidad. Las bacterias patógenicas de plantas del género *Xanthomonas* son conocidas por causar muchas enfermedades en importantes plantas de cultivo. La patogenicidad de *Xanthomonas* depende de un sistema conservado de secreción de tipo III (T3S) que

inyecta proteínas efectoras más que diferentes en la célula de planta. Entre estas proteínas inyectadas están las efectoras tipo activador de transcripción (TALEN), que imitan los activadores de transcripción de plantas y manipulan el transcriptoma de planta (véase Kay *et al* (2007) *Science* 318:648–651). Estas proteínas contienen un dominio de unión a ADN y un dominio de activación transcripcional. Uno de los efectores TAL mejor caracterizados es AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (véase Bonas *et al* (1989) *Mol Gen Genet* 218: 127–136 y WO2010079430). Los efectores TAL contienen un dominio centralizado de repeticiones en tándem, donde cada repetición contiene aproximadamente 34 aminoácidos, los cuales son clave para la especificidad de unión al ADN de estas proteínas. Asimismo, contienen una secuencia de localización nuclear y un dominio de activación transcripcional ácido (para una revisión, véase Schornack S, *et al* (2006) *J Plant Physiol* 163(3): 256–272). Además, en las bacterias fitopatógenicas *Ralstonia solanacearum*, se ha descubierto que dos genes, designados *brg11* y *hpx17*, son homólogos a la familia AvrBs3 de *Xanthomonas* en la cepa biovar de *R. solanacearum* GMI1000 y en la cepa biovar 4 RS1000 (véase Heuer *et al* (2007) *Appl and Enviro Micro* 73(13): 4379–4384). Estos genes son un 98,9% idénticos en cuanto a secuencia de nucleótidos entre sí, pero difieren por una delección de 1.575 bp en el dominio de repetición de *hpx17*. Sin embargo, ambos productos génicos tienen menos de 40% de identidad de secuencia con proteínas de la familia AvrBs3 de *Xanthomonas*. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. Nro. 20110301073, incorporada por referencia en su totalidad.

La especificidad de estos efectores TAL depende de las secuencias halladas en las repeticiones en tándem. La secuencia repetida comprende aproximadamente 102 bp, y las repeticiones son típicamente 91–100% homólogas entre sí (Bonas *et al*, *ibíd.*). El polimorfismo de las repeticiones generalmente se ubica en las posiciones 12 y 13, y parece haber una correspondencia uno a uno entre la identidad de los di-residuos hipervariables en las posiciones 12 y 13 con la identidad de los nucleótidos contiguos en la secuencia blanco del efector TAL (véase Moscou y Bogdanove, (2009) *Science* 326:1501 y Boch *et al* (2009) *Science* 326:1509–1512). Experimentalmente, el código

natural para el reconocimiento de ADN de estos efectores TAL se ha determinado de modo tal que una secuencia HD en las posiciones 12 y 13 conduzca a una unión a citosina (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 lograr factores de transcripción artificiales que sean capaces de interactuar con nuevas secuencias y activar la expresión de un gen reportero no endógeno en las células de plantas (Boch *et al*, *ibíd.*). Proteínas TAL modificadas por ingeniería genética se han unido a un medio dominio de escisión de *FokI* para proporcionar una fusión de nucleasa de dominio efector TAL (TALEN) que exhibe actividad en un ensayo de reportero de levadura (blanco basado en plásmido).

El sistema de nucleasa CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Interespaciadas Regularmente y Agrupadas)/Cas (Asociado a CRISPR) es un sistema de nucleasa recientemente modificado por ingeniería genética basado en un sistema bacteriano que se puede usar para la modificación de genomas. Se basa en parte de la respuesta inmune adaptativa de muchas bacterias y arqueas. Cuando un virus o plásmido invade una bacteria, segmentos del ADN del invasor son convertidos en ARN de CRISPR (ARNcr) por la respuesta ‘inmune’. Este ARNcr luego se asocia, a través de una región de complementariedad parcial, con otro tipo de ARN llamado ARNtracr para guiar la nucleasa Cas9 a una región homóloga al ARNcr en el ADN blanco, llamada “protoespaciador”. Cas9 escinde el ADN para generar extremos romos en el DSB en sitios especificados por una secuencia guía de 20 nucleótidos contenida dentro del transcripto de ARNcr. Cas9 requiere tanto el ARNcr y como el ARNtracr para el reconocimiento y la escisión de ADN sitio-específico. Este sistema ahora ha sido modificado de modo tal que el ARNcr y el ARNtracr se puedan combinar en una molécula (el “ARN guía único”), y la porción equivalente de ARNcr del ARN guía único se puede modificar para guiar la nucleasa Cas9 para apuntar a cualquier secuencia deseada (véase 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

se puede modificar por ingeniería genética para crear una ruptura de doble cadena (DSB) en un blanco deseado de un genoma, y la reparación de la DSB puede verse influenciada por el uso de inhibidores de reparación, que causan un aumento en la reparación proclive a errores.

En otros ejemplos, el transgen de unión a ADN es una nucleasa sitio-específica que comprende una meganucleasa modificada (no natural) (también descrita como endonucleasa de hogar). Las secuencias de reconocimiento de las endonucleasas de hogar o meganucleasas, 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 y I-TevIII, son conocidas. Véase también la Patente de EE.UU. Nro. 5.420.032; Patente de EE.UU. Nro. 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 a ADN de las endonucleasas de hogar y meganucleasas se puede modificar para unirse a sitios blanco no naturales. Véase, por ejemplo, Chevalier *et al.* (2002) *Molec. Cell* 10:895–905; Epinat *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 5 31:2952–2962; Ashworth *et al.* (2006) *Nature* 441:656–659; Paques *et al.* (2007) *Current Gene Therapy* 7:49–66; Publicación de Patente de EE.UU. Nro. 20070117128. Los dominios de unión a ADN de las endonucleasas de hogar y meganucleasas se pueden alterar en el contexto de la nucleasa como un todo (es decir, de modo tal que la nucleasa incluya el dominio de escisión cognado) o se pueden fusionar con un dominio de escisión heterólogo.

Según se usa en la presente, el término “transformación” abarca todas las técnicas mediante las cuales una molécula de ácido nucleico se puede introducir en dicha célula. Los ejemplos incluyen, aunque no a modo de limitación: transfección con vectores virales; transformación con vectores plásmidos; electroporación; lipofección; microinyección (Mueller *et al.* (1978) *Cell* 15:579–85); transferencia mediada por *Agrobacterium*; captación directa de ADN; transformación mediada por WHISKERS™; y bombardeo de

microproyectiles. Estas técnicas se pueden usar tanto para la transformación estable como para la transformación transitoria de una célula de planta. La "transformación estable" se refiere a la introducción de un fragmento de ácido nucleico en un genoma de un organismo huésped, que resulta en una herencia genéticamente estable. Una vez transformado establemente, el fragmento de ácido nucleico es integrado establemente en el genoma del organismo huésped y cualquier generación subsiguiente. Los organismos huésped que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos "transgénicos". La "transformación transitoria" se refiere a la introducción de un fragmento de ácido nucleico en el núcleo, u orgánulo que contiene el ADN, de un organismo huésped que resulta en la expresión génica sin herencia genéticamente estable.

Según se usa en la presente, el término “transducir” se refiere a un proceso en el cual un virus transfiere ácido nucleico a una célula.

Según se usa en la presente, el término “transgen” se refiere a una secuencia de ácido nucleico exógena. En un ejemplo, un transgen es una secuencia génica (por ejemplo, un gen de resistencia a herbicidas), un gen que codifica un compuesto útil desde el punto de vista industrial o farmacéutico, o un gen que codifica un rasgo agrícola deseable. En incluso otro ejemplo, un transgen es un ARN pequeño, tal como una secuencia de ácido nucleico antisentido, en donde la expresión de la secuencia de ARN pequeño inhibe la expresión de una secuencia de ácido nucleico blanco. Un transgen puede contener secuencias regulatorias unidas operativamente al transgen (por ejemplo, un promotor, intrón o 3'–UTR). En algunas formas de realización, un ácido nucleico de interés es un transgen. Sin embargo, en otras formas de realización, un ácido nucleico de interés es un ácido nucleico endógeno, en donde se desean copias genómicas adicionales del ácido nucleico endógeno, o un ácido nucleico que está en orientación antisentido con respecto a la secuencia de un ácido nucleico blanco en un organismo huésped.

Según se usa en la presente, el término “ARN pequeño” se refiere a varias clases de ácido ribonucleico no codificador (ARNnc). El término “ARN pequeño” describe las cadenas cortas de ARNnc producidas en células bacterianas, animales, plantas y hongos.

Estas cadenas cortas de ARNnc se pueden producir naturalmente dentro de la célula o se pueden producir por la introducción de una secuencia exógena que expresa la cadena corta o ARNnc. Las secuencias de ARN pequeño no codifican directamente una proteína y difieren en cuanto a función de otros ARN en el hecho de que las secuencias de ARN pequeño sólo se transcriben y no se traducen. Las secuencias de ARN pequeño están involucradas en otras funciones celulares, incluida la expresión y modificación de genes. Las moléculas de ARN pequeño generalmente están compuestas por aproximadamente 20 a 30 nucleótidos. Las secuencias de ARN pequeño se pueden derivar de precursores más largos. Los precursores forman estructuras que se pliegan sobre sí mismos en regiones de auto-complementariedad; luego son procesados por la nucleasa Dicer en animales o DCL1 en plantas.

Muchos tipos de ARN pequeño existen naturalmente o se producen en forma artificial, incluidos microARN (miARN), ARN de interferencia cortos (ARNsi), ARN antisentido, ARN de horquilla cortos (ARNsh) y ARN nucleolares pequeños (ARNsno). Ciertos tipos de ARN pequeño, tales como microARN y ARNsi, son importantes en la silenciación génica y la interferencia de ARN (ARNi). La silenciación génica es un proceso de regulación genética en el cual un gen que normalmente se expresaría es “apagado” por un elemento intracelular, en este caso, el ARN pequeño. La proteína que se formaría normalmente por esta información genética no se forma debido a la interferencia, y la información codificada en el gen es bloqueada de la expresión.

Según se usa en la presente, el término “ARN pequeño” abarca moléculas de ARN descritas en la bibliografía como “ARN diminuto” (Storz, (2002) *Science* 296:1260–3; Illangasekare *et al.*, (1999) *ARN* 5:1482–1489); “ARN pequeño” procariota (ARNs) (Wassarman *et al.*, (1999) *Trends Microbiol.* 7:37–45); “ARN no codificador (ARNnc) eucariota”; “micro-ARN (miARN)”; “no ARNm pequeño (ARNsnm)”; “ARN funcional (ARNf)”; “ARN de transferencia (ARNt)”; “ARN catalítico” [por ejemplo, ribozimas, incluidos ribozimas auto-acilantes (Illangaskare *et al.*, (1999) *ARN* 5:1482–1489); “ARN nucleolares pequeños (ARNsno)”; “ARNtm” (también conocidos como “ARN 10S”, Muto *et al.*, (1998) *Trends Biochem Sci.* 23:25–

29; y Gillet *et al.*, (2001) *Mol Microbiol.* 42:879–885); moléculas de ARNi, que incluyen, sin limitaciones, “ARN de interferencia pequeños (ARNsi)”, “ARNsi preparado por endorribonucleasa (e-siARN)”, “ARN en horquilla corto (ARNsh)” y “ARN pequeño regulado temporalmente (ARNst)”; “ARNsi en cubos (d-siARN)”, y aptámeros, oligonucleótidos y otros ácidos nucleicos sintéticos que comprenden al menos una base de uracilo.

Según se usa en la presente, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico introducida en una célula, con lo cual se produce una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en la célula huésped, tales como un origen de replicación. Los ejemplos incluyen, aunque no a modo de limitación, un plásmido, cósmido, bacteriófago, cromosoma artificial bacteriano (BAC) o virus que porta ADN exógeno en una célula. Un vector también puede incluir uno o varios genes, moléculas antisentido y/o genes de marcador seleccionable y otros elementos genéticos conocidos en el arte. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, lo cual hace que la célula exprese las moléculas de ácido nucleico y/o proteínas 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).

Según se usa en la presente, los términos “casete”, “casete de expresión” y “casete de expresión génica” se refieren a un segmento de ADN que se puede insertar en un ácido nucleico o polinucleótido en sitios de restricción específicos o por 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 diseñan para asegurar la inserción del casete en el marco de lectura apropiado para la transcripción y traducción. En una forma de realización, un casete de expresión puede incluir un polinucleótido que codifica un ARN pequeño o un polipéptido de interés y que tiene elementos además del polinucleótido que facilitan la transformación de una célula huésped particular. En una forma de realización, un casete de expresión génica también puede incluir elementos que permiten una mejor expresión de un ARN pequeño o un polinucleótido que codifica

un polipéptido de interés en una célula huésped. Estos elementos pueden incluir, aunque no a modo de limitación: un promotor, un promotor mínimo, un mejorador, un elemento de respuesta, un intrón, una región 5' no traducida, una secuencia de región 3' no traducida, una secuencia de terminación, una secuencia de poliadenilación y similares.

Según se usa en la presente, el término “secuencia codificadora heteróloga” se usa para indicar cualquier polinucleótido que codifica, o que en última instancia codifica, un péptido o proteína o su secuencia de aminoácidos equivalente, por ejemplo, una enzima, que no está presente normalmente en el organismo huésped y se puede expresar en la célula huésped en condiciones adecuadas. Como tales, las “secuencias codificadoras heterólogas” pueden incluir una o más copias de secuencias codificadoras que no están presentes normalmente en la célula huésped, de modo que la célula expresa copias adicionales de una secuencia codificadora que no está presente normalmente en las células. Las secuencias codificadoras heterólogas pueden ser ARN o cualquier tipo de éste, por ejemplo, ARNm, ADN o cualquier tipo de éste, por ejemplo, ADNc, o un híbrido de ARN/ADN. Los ejemplos de secuencias codificadoras incluyen, aunque no a modo de limitación, unidades de transcripción de longitud completa que comprenden características tales como la secuencia de codificación, intrones, regiones promotoras, 5'-UTR, 3'-UTR y regiones mejoradoras.

Las “secuencias codificadoras heterólogas” también incluyen la porción codificadora del péptido o enzima, es decir, la secuencia de ADNc o ARNm, del péptido o enzima, así como la porción codificadora de la unidad transcripcional de longitud completa, es decir, el gen que comprende intrones y exones, así como secuencias “optimizadas con codón”, secuencias truncadas u otras formas de secuencias alteradas que codifican la enzima o codifican su secuencia de aminoácidos equivalente, siempre y cuando la secuencia de aminoácidos equivalente produzca una proteína funcional. Dichas secuencias de aminoácidos equivalentes pueden tener una delección de uno o varios aminoácidos, donde la delección es N-terminal, C-terminal o interna. Se prevén formas truncadas en tanto tengan la capacidad catalítica indicada en la presente.

Según se usa en la presente, el término “control” se refiere a una muestra usada en un procedimiento analítico con fines de comparación. Un control puede ser “positivo” o “negativo”. Por ejemplo, cuando el fin de un procedimiento analítico es detectar un transcripto o polipéptido diferencialmente expresado en células o tejidos, generalmente es preferible incluir un control positivo, tal como una muestra de una planta conocida que exhibe la expresión deseada, y un control negativo, tal como una muestra de una planta conocida que carece de la expresión deseada.

Según se usa en la presente, el término “planta” incluye plantas y partes de plantas, incluyendo, aunque sin limitaciones, células de plantas y tejidos de plantas tales como hojas, tallos, 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 superiores e inferiores susceptibles de mutagénesis, que incluyen angiospermas, gimnospermas, helechos y algas multicelulares. De esta forma, una “planta” incluye plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Los ejemplos de plantas dicotiledóneas incluyen tabaco, *Arabidopsis*, soja, tomate, papaya, canola, girasol, algodón, alfalfa, papa, vid, guisantes, arvejas, *Brassica*, garbanzos, remolacha azucarera, colza, sandía, melón, pimiento, maní, calabaza, rábano, espinaca, zapallo, 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, espadañas, lirios, avena, cebolla, mijo y triticale.

Según se usa en la presente, el término “material de planta” se refiere a hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutos, polen, óvulos, cigotos, semillas, cortes, cultivos celulares o tisulares, o cualquier otra parte o producto de una planta. En una forma de realización, el material de planta incluye cotiledones y hojas. En una forma de realización, el material de planta incluye tejidos radicales y otros tejidos de plantas ubicados bajo tierra.

Según se usa en la presente, el término “gen de marcador seleccionable” se refiere a un gen que se usa opcionalmente en la transformación de plantas en, por ejemplo, células de plantas protegidas a partir de un agente selectivo o para

proporcionar resistencia/ tolerancia a un agente selectivo. Además, un “gen de marcador seleccionable” abarca genes reporteros. Sólo aquellas célula o plantas que reciben un marcador seleccionable funcional son capaces de dividirse o crecer en condiciones que poseen un agente selectivo. Los ejemplos de agentes selectivos pueden incluir, por ejemplo, antibióticos, incluidas 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 de marcador seleccionable pueden incluir genes que codifican resistencia a herbicidas, que incluyen *bar* o *pat* (resistencia contra glufosinato amonio fosfinotricina), *acetolactato sintasa* (ALS, resistencia contra inhibidores tales como sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TP), pirimidinil oxibenzoatos (POB) y sulfonilamino carbonil triazolinonas que previenen el primer paso en la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada), glifosato, 2,4-D, y resistencia o sensibilidad a los metales. Los ejemplos de “genes reporteros” que se pueden usar como gen de marcador seleccionable incluyen la observación visual de proteínas de gen reportero expresadas, tales como proteínas que codifican β -glucuronidasa (GUS), luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), DsRed, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), fosfatasa alcalina y similares. La frase “marcador positivo” se refiere a plantas que han sido transformadas para incluir un gen de marcador seleccionable.

Según se usa en la presente, el término “marcador detectable” se refiere a una etiqueta susceptible de detección, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, compuesto quimioluminiscente, quelante de metal o enzima. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, aunque no a modo de limitación, los siguientes: etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, lantanida fósforo), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -

galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), etiquetas quimioluminiscentes, grupos biotinilo, epítomos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un reportero secundario (por ejemplo, secuencias de pares cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítomos). En una forma de realización, un marcador detectable se puede unir a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el potencial impedimento estérico.

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

A menos que se explique específicamente lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que comúnmente entiende el especialista en el arte al que pertenece esta divulgación. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden hallar, 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 regulatorios

Los promotores de plantas usados para investigación básica o aplicaciones biotecnológicas generalmente son unidireccionales, y dirigen la expresión de un transgen que se ha fusionado en su extremo 3' (corriente abajo). A menudo es necesario expresar robustamente transgenes dentro de plantas para el diseño genético metabólico y apilamiento de rasgos. Además, generalmente se requieren múltiples promotores nuevos en los cultivos transgénicos para impulsar la expresión de múltiples genes. En la presente se divulga un promotor quimérico que puede dirigir la expresión de un transgen que se ha fusionado en su extremo 3' (corriente abajo).

El desarrollo de productos transgénicos se está volviendo cada vez más complejo, lo cual requiere la expresión robusta de transgenes y el apilamiento de múltiples transgenes en un único locus. Tradicionalmente, cada transgen requiere un promotor único para la expresión, en donde se requieren múltiples promotores para expresar diferentes transgenes

dentro de una pila de genes. Con el creciente tamaño de las pilas de genes, esto frecuentemente conduce al uso repetido del mismo promotor para obtener niveles similares de patrones de expresión de diferentes transgenes para la expresión de un solo rasgo poligénico. Se sabe que los constructos multi-genes impulsados por el mismo promotor causan silenciación de genes, lo cual resulta en productos transgénicos menos eficaces en el campo. El exceso de sitios de unión al factor de transcripción (TF) debido a la repetición del promotor puede causar depleción de TF endógenos, que conduce a la inactivación transcripcional. La silenciación de transgenes probablemente afectará en forma no deseada el rendimiento de una planta transgénica producida para expresar transgenes. Las secuencias repetitivas dentro de un transgen pueden conducir a la recombinación homóloga intra locus de los genes, que resulta en redistribuciones de los polinucleótidos.

Los promotores específicos de tejidos (es decir, preferidos por los tejidos) o específicos de órganos impulsan la expresión génica en un determinado tejido, tal como en el grano, la raíz, la hoja o el tapetum de la planta. Los promotores específicos de tejidos y estadio de desarrollo impulsan la expresión de genes, los cuales se expresan en tejidos particulares o en períodos de tiempo particulares durante el desarrollo de la planta. Los promotores específicos de tejidos se requieren para ciertas aplicaciones en la industria de las plantas transgénicas y son deseables ya que permiten la expresión específica de genes heterólogos de manera selectiva del tejido y/o estadio de desarrollo, lo cual indica la expresión del gen heterólogo diferencialmente en diversos órganos, tejidos y/o momentos, pero no en otros. Por ejemplo, se podría lograr mayor resistencia de una planta a la infección por parte de patógenos del suelo mediante la transformación del genoma de la planta con un gen de resistencia al patógeno, de modo que la proteína de resistencia al patógeno se exprese robustamente dentro de las raíces de la planta. Alternativamente, puede ser deseable expresar un transgen en tejidos de planta que se encuentran en una fase de crecimiento o desarrollo particular, tal como, por ejemplo, división celular o elongación. Otra aplicación consiste en el uso de promotores específicos de tejidos, por ejemplo de modo tal que confine la expresión de los transgenes que codifican un rasgo agronómico en el xilema en desarrollo. Un problema

particular que sigue existiendo en la identificación de promotores específicos de tejidos es cómo identificar los genes potencialmente más importantes y sus correspondientes promotores, y cómo relacionarlos con propiedades de desarrollo específicas de la célula. Otro problema es clonar todos los elementos de control transcripcional de acción *cis* relevantes de modo que el fragmento de ADN clonado impulse la transcripción en el patrón de expresión específico deseado. Un problema particular es identificar promotores específicos de tejidos, relacionados con tipos celulares específicos, estadios de desarrollo y/o funciones en la planta que no son expresados en otros tejidos de la planta.

La expresión de transgenes también puede ser regulada por un intrón y 5'–región UTR ubicados corriente abajo de la secuencia promotora. Un promotor quimérico que comprende un promotor corriente arriba unido operativamente a un intrón, y 5'–UTR pueden regular la expresión transgénica. Aunque un promotor corriente arriba es necesario para impulsar la transcripción, la presencia de un intrón y 5'–UTR puede aumentar los niveles de expresión, lo que resulta en un transcripto de ARNm para traducción y síntesis de proteínas. La adición de un intrón y 5'–UTR a una secuencia de polinucleótidos promotora corriente arriba puede ayudar a la expresión estable de un transgen.

Se proporcionan métodos y constructos usando un elemento regulatorio génico promotor quimérico que comprende un promotor corriente arriba a partir de peroxidasa 5 de *Zea mays*, seguido por el intrón 6 de alcohol deshidrogenasa (I) de *Zea mays* y 5'–UTR del virus de la veta del maíz (por ejemplo, líder) para expresar transgenes en una planta. En una forma de realización, un promotor quimérico puede ser un promotor de:

ACCACTGTTGTAACCTTGTAAGCCACTAGCTCACGTTCTCCATGAGCTCTTCT
CTCTGCTGTTTCTTCCTCTGCTAACTGCGTTATGATATGACGTCGTATAAATA
ATCTCACAATACTTCCTTATTTTCAGCATGGCCTCTTTTATGTTTATTTAACA
GTAGCAACCAACGCCGCTCGATGTTTCCTTCAAGAAACGGCCACTCACTATG
TGGTGTGCAGAAGAACAAATGTAAGCAGCTCCTACAGGTACCAGTAGTCAT
GTCAGTGTGGAAGCTTTCCAACCAACGCCTCCTTCGAGGAACCTGGTCGTGC
TGACATGAATGTAGGCCATGCAAGCACAAGCACCTAACGCGAATCATCACG
ACGCGCCGTGTACTGGGCGTTGGTACATCACACCCCGCGTTTGACCTGATCG
GAAGCATGCGTGTGTGTTGGCTGCAGGACCGGCTATAGGTTTCCTGCATTGG
ACAGCAGAAGCCAGTCATGTTAGGCACTCACGCGCTCCTGCCGTTTGATGA
ATCATCCGGTCTTTTCGTATTGATCACTAGTTCCTACTACGCTGATATAGCAAAT
TTTAAGATGTGAAACCACGAGACGAGCGATAAATCTTAGACGTTACCTATC
CATATGAAGCTTGTGCGAAAAAAGGCGTGCCGCTGTAGCATCATTTCGTAT
ACACTTTTGTCCCCAAAGACAGGGATACGAATCCATGCTCGACAGAACCCT
CCCTTCCTGCAGATAACGACACTTAAGTATAACAAAAGTAGTTGGATTATT
TCAGAAGCAAAATCTCACTTTTCGCTGGCCTTTTTGTACTTTGGTTACTTGAG
TTCAGACAGTGTATGCTATATTGTCATGTGCTGCGTAAGGTTTAAATATGGT
TCGACAAATATATCAGTATATCACTACTTTGTTATGGGTGGGGCCTAGCACA
AACTTGATACAGCTAGGATAAAGTTAGAACGATGACTGATCTACTGTAAAG
CGACACCTGTCCTGTTATGGTAGTTTAAGTCCATTCCTGGACGACTCCAGAT
CCAGGATATGATGCTGTTACATAATGCGATTGTTTACAATAAAATTGCATGA
TGTTCTTCTACTCTTTAGGCAGTTTTGTTCAACAGGCAAGTTGCATAATGCAT
GTGCATATATGAGCAGCATAATCATCAATTAATCATAGGTTTCGTCATTTTAG
TTTCACTCCTTCACATTATTCCAGCCCTTGAAGAAAAATGTAGCAGTGCTTG
CTGTTTAATAAGTGGCAGAGCTGTTTTCACTCCACCTACGCTTGTCTAGGAC
CAAAATTTTAATCTGTCACTTTGAGCTAAAACTGAAGCACCAAACCGCTACA
AAAGAACGTAGGAGCTGAATTGTAACCTTGATGGGATTACTATAGCAGTTGC
TACAGTTCTAGCTAGCTACCTTATTCTATACGCATCACCTAACAACCCGGC

TGACTGCTGCATCTGACCCACCGTCCCCTGCTCCAAACCAACTCTCCTTTC
 CTTGCATGCACTACACCCACTTCCTGCAGCTATATATACCACCATATGCCCA
 TCTTATGAAACCATCCACAAGAGGAGAAGAAACAATCAACCAGCAACACTC
 TTCTCTTATAACATAGTACAGCGAAGGTAACCTCACGGTACCCTGAAGGCTCG
 ACAAGGCAGTCCACGGAGGAGCTGATATTTGGTGGACAAGCTGTGGATAGG
 AGCAACCCTATCCCTAATATACCAGCACCACCAAGTCAGGGCAATCCCCAG
 ATCACCCCAGCAGATTCTGAAGAAGGTACAGTACACACACATGTATATATGT
 ATGATGTATCCCTTCGATCGAAGGCATGCCTTGGTATAATCACTGAGTAGTC
 ATTTTATTACTTTGTTTTGACAAGTCAGTAGTTCATCCATTTGTCCCATTTTTT
 CAGCTTGGAAGTTTGTTTGCAGTGGCCTTGGTCTAATAACTGAGTAGTCATT
 TTATTACGTTGTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCATTTTTTCA
 GCTAGGAAGTTTGTTTGCAGTGGCCTTGGACTAATAACTGATTAGTCATTTT
 ATTACATTGTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCATTTTTTCAGCT
 AGGAAGTTCGGATCTGGGGCCATTTGTTCCAGGCACGGGATAAGCATTTCAG
 (SEC. ID NRO.:1)

En una forma de realización, un casete de expresión génica comprende un promotor. En una forma de realización, un promotor puede ser un promotor quimérico de la presente divulgación. En una forma de realización, un casete de expresión génica comprende un promotor, en donde el promotor es al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% o 100% idéntico a SEC. ID NRO.:1. En una forma de realización, un casete de expresión génica comprende un promotor quimérico que está unido operativamente a un transgen. En una forma de realización, un casete de expresión génica que comprende el promotor quimérico puede impulsar la expresión de dos o más transgenes. En una forma de realización ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un promotor quimérico que está unido operativamente a un transgen, en donde el transgen puede ser un transgen de resistencia a insecticidas, un transgen de tolerancia a herbicidas, un transgen de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgen de eficiencia en el uso de agua, un transgen de calidad nutricional,

un transgen de unión a ADN, un transgen de marcador seleccionable o combinaciones de ellos.

Marcadores seleccionables

Diversos marcadores seleccionables también descritos como genes reporteros se pueden incorporar en un vector de expresión elegido para permitir la identificación y selección de plantas transformadas (“transformantes”). Se dispone de muchos métodos para confirmar la expresión de marcadores seleccionables en plantas transformadas, que incluyen, por ejemplo, secuenciación de ADN y PCR (reacción en cadena de polimerasa), Southern blotting, blotting de ARN, métodos inmunológicos para detección de una proteína expresada a partir del vector, por ejemplo, proteína precipitada que media la resistencia a fosfinotricina, u observación visual de otras proteínas tales como genes reporteros que codifican β -glucuronidasa (GUS), luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), DsRed, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), fosfatasa alcalina y similares (véase Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001, cuyo contenido se incorpora a la presente por referencia en su totalidad).

Los genes de marcador seleccionable se utilizan para la selección de células o tejidos transformados. Los genes de marcador seleccionable incluyen genes que codifican resistencia a antibióticos, tales como aquellos que codifican neomicina fosfotransferasa II (NEO) e higromicina fosfotransferasa (HPT), así como genes que confieren resistencia a compuestos herbicidas. Los genes de resistencia a herbicidas generalmente codifican una proteína blanco modificada insensible al herbicida o una enzima que degrada o detoxifica el herbicida en la planta antes de que pueda actuar. Por ejemplo, se ha obtenido resistencia al glifosato usando genes que codifican enzimas blanco mutantes, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Los genes y mutantes para EPSPS son bien conocidos, y se describen adicionalmente a continuación. Se ha obtenido resistencia a glufosinato amonio, bromoxinilo y 2,4-

diclorofenoxiacetato (2,4-D) usando genes bacterianos que codifican *pat* o *DSM-2*, una *nitrilasa*, un gen *aad-1* o un gen *aad-12*, que destoxifica los respectivos herbicidas.

En una forma de realización, los herbicidas pueden inhibir el punto de crecimiento o meristema, incluidos imidazolinona o sulfonilurea, y los genes para resistencia/ tolerancia de ácido acetohidroxi sintasa (AHAS) y acetolactato sintasa (ALS) para estos herbicidas son bien conocidos. Los genes de resistencia al glifosato incluyen genes mutantes de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPs) y *dgt-28* (a través de la introducción de ácidos nucleicos recombinantes y/o diversas formas de mutagénesis *in vivo* de genes EPSP nativos), genes *aroA* y genes de glifosato acetil transferasa (GAT), respectivamente). Los genes de resistencia para otros compuestos fosfono incluyen genes *bar* de especie *Streptomyces*, incluidas *Streptomyces hygroscopicus* y *Streptomyces viridichromogenes*, y ácidos piridinoxi o fenoxi propriónicos y ciclohexonas (genes que codifican inhibidores de ACCasa). Los ejemplos de genes que confieren resistencia a ciclohexandionas y/o ácido ariloxifenoxipropanoico (incluidos haloxifop, diclofop, fenoxiprop, fluazifop, quizalofop) incluyen genes de acetil coenzima A carboxilasa (ACCasa)-*Acc1-S1*, *Acc1-S2* y *Acc1-S3*. En una forma de realización, los herbicidas pueden inhibir la fotosíntesis, incluidos triazina (genes *psbA* y *1s+*) o benzonitrilo (gen de nitrilasa).

En una forma de realización, los genes de marcador seleccionable incluyen, aunque no a modo de limitación, genes que codifican: neomicina fosfotransferasa II; cianamida hidratasa; aspartato quinasa; dihidrodipicolinato sintasa; triptofano decarboxilasa; dihidrodipicolinato sintasa y aspartato quinasa desensibilizada; gen *bar*; triptofano decarboxilasa; neomicina fosfotransferasa (NEO); higromicina fosfotransferasa (HPT o HYG); dihidrofolato reductasa (DHFR); fosfinotricina acetiltransferasa; ácido 2,2-dicloropropiónico dehalogenasa; ácido acetohidroxi sintasa; 5-enolpiruvil-shikimato-fosfato sintasa (*aroA*); haloarilnitrilasa; acetil-coenzima A carboxilasa; dihidropteroato sintasa (*sul I*); y polipéptido 32 kD fotosistema II (*psbA*).

Una forma de realización también incluye genes que codifican resistencia a: cloranfenicol; metotrexato; higromicina; espectinomycin; bromoxinilo; glifosato; y fosfinotricina.

La lista anterior de genes de marcador seleccionable no tiene por fin ser limitativa. Cualquier reportero o gen de marcador seleccionable está comprendido por la presente invención.

Los genes de marcador seleccionable se sintetizan para su óptima expresión en una planta. Por ejemplo, en una forma de realización, una secuencia codificadora de un gen se ha modificado por optimización de codones para mejorar la expresión en plantas. Un gen de marcador seleccionable se puede optimizar para la expresión en una especie de planta en particular o, alternativamente, se puede modificar para la expresión óptima en plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas. Los codones preferidos para plantas se pueden determinar a partir de los codones de mayor frecuencia en las proteínas expresadas en mayor cantidad en la especie de planta particular de interés. En una forma de realización, un gen de marcador seleccionable se diseña para ser expresado en plantas a un nivel superior, lo que resulta en una mayor eficiencia de transformación. Los métodos para optimización de genes en plantas son bien conocidos. Se puede obtener una guía respecto de la optimización y preparación de secuencias de polinucleótidos sintéticos en, por ejemplo, WO2013016546, WO2011146524, WO1997013402, Patente de EE.UU. Nro. 6166302 y Patente de EE.UU. Nro. 5.380.831, que se incorporan a la presente por referencia.

Transgenes

Los métodos y composiciones divulgados se pueden usar para expresar secuencias génicas de polinucleótidos dentro del genoma de la planta. Por consiguiente, la expresión de genes que codifican tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos, nutrientes, antibióticos o moléculas terapéuticas puede ser impulsada por un promotor de plantas.

En una forma de realización, el elemento regulatorio quimérico de la presente divulgación se combina o se une operativamente con un gen que codifica secuencias de

polinucleótidos que proporcionan resistencia o tolerancia a glifosato u otro herbicida, y/o proporcionan resistencia a insectos o enfermedades seleccionadas y/o mejoras nutricionales, y/o mejores características agronómicas, y/o proteínas u otros productos útiles en los alimentos para animales, alimentos para humanos, industria, farmacia u otros usos. Los transgenes se pueden “apilar” con dos o más secuencias de ácido nucleico de interés dentro de un genoma de planta. El apilamiento se puede lograr, por ejemplo, a través del cultivo de plantas convencional usando dos o más eventos, la transformación de una planta con un constructo que contiene las secuencias de interés, la re-transformación de una planta transgénica, o la adición de nuevos rasgos a través de la integración dirigida por recombinación homóloga.

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

1. Genes o secuencias codificadoras (por ejemplo, ARNi) que confieren resistencia a plagas o enfermedades:

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

- (B) Una proteína de *Bacillus thuringiensis*, un derivado de ella o un polipéptido sintético modelado respecto de ella, tal como una secuencia de nucleótidos de un gen de Bt d-endotoxina (Geiser *et al.*, 1986 *Gene* 48:109) y un gen insecticida vegetativo (VIP) (véase, por ejemplo, Estruch *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:5389-94). Más aún, las moléculas de ADN que codifican genes de d-endotoxina se pueden obtener de la

American Type Culture Collection (Rockville, Md.), bajo números de acceso ATCC 40098, 67136, 31995 y 31998.

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

(D) Una proteína de unión a vitamina, tal como avidina y homólogos de avidina, que son útiles como larvicidas contra plagas de insectos. Véase la Patente de EE.UU. Nro. 5.659.026.

(E) Un inhibidor de enzimas, por ejemplo, un inhibidor de proteasa o un inhibidor de amilasa. Los ejemplos de dichos genes incluyen un inhibidor de cisteína proteinasa del arroz (Abe *et al.*, 1987 *J. Biol. Chem.* 262:16793), un inhibidor de proteinasa del tabaco I (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 hormona o feromona específica de insectos, tal como un ecdisteroide y hormona juvenil, una variante de ella, un mimético basado en ella, o un antagonista o agonista de ella, tal como la expresión de baculovirus de la hormona esterasa juvenil clonada, un inactivador de la hormona juvenil (Hammock *et al.*, 1990 *Nature* 344:458).

(G) Un péptido o neuropéptido específicos de insectos que, tras la expresión, altera la fisiología de la plaga afectada (*J. Biol. Chem.* 269:9). Los ejemplos de dichos genes incluyen un receptor de hormona diurética de insecto (Regan, 1994), una alostatina identificada en *Diploptera punctata* (Pratt, 1989) y neurotoxinas parálíticas específicas de insectos (Patente de EE.UU. Nro. 5.266.361).

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

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

(J) Una enzima involucrada en la modificación, incluida la modificación post-traduccion, de una molécula biológicamente activa; por ejemplo, una enzima glicolítica,

una enzima proteolítica, una enzima lipolítica, una nucleasa, una ciclasa, una transaminasa, una esterasa, una hidrolasa, una fosfatasa, una quinasa, una fosforilasa, una polimerasa, una elastasa, una quitinasa y una glucanasa, ya sea natural o sintética. Los ejemplos de dichos genes incluye un gen de callos (solicitud PCT publicada WO93/02197), secuencias que codifican quitinasa (que se pueden obtener, por ejemplo, a partir de la ATCC bajo los números de acceso 3999637 y 67152), quitinasa del anquilostoma del tabaco (Kramer *et al.*, 1993 Insect Molec. Biol. 23:691) y 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 dichas moléculas incluyen secuencias de nucleótidos para clones de ADNc de calmodulina del frijol mungo (Botella *et al.*, 1994 Plant Molec. Biol. 24:757) y una secuencia de nucleótidos de un clon de ADNc de calmodulina del maíz (Griess *et al.*, 1994 Plant Physiol. 104:1467).

(L) Un péptido de momento hidrofóbico. Véase las Patentes de EE.UU. Nros. 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, tal como un análogo de péptido cecropin- β lítico (Jaynes *et al.*, 1993 Plant Sci. 89:43) que transforma a las plantas transgénicas de tabaco en resistentes a *Pseudomonas solanacearum*.

(N) Una proteína invasiva viral o una toxina compleja derivada de ella. Por ejemplo, la acumulación de proteínas de recubrimiento viral en células de plantas transformadas imparte resistencia a las infecciones virales y/o al desarrollo de enfermedades efectuadas por el virus del cual deriva el gen de la proteína de recubrimiento, así como por virus relacionados. Se ha conferido resistencia mediada por proteína de recubrimiento a plantas transformadas contra el virus mosaico de la alfalfa, el virus mosaico del pepino, el virus de la veta del tabaco, el virus X de la papa, el virus Y de la papa, el virus del grabado del tabaco, el virus cascabel del tabaco y el virus

mosaico del tabaco. Véase, por ejemplo, Beachy *et al.* (1990) *Ann. Rev. Phytopathol.* 28:451.

(O) Un anticuerpo específico de insectos o una inmunotoxina derivada de él. Por lo tanto, un anticuerpo dirigido a una función metabólica crítica en el intestino del insecto inactivaría una enzima afectada, y mataría al insecto. Por ejemplo, Taylor *et al.* (1994) Resumen Nro. 497, Seventh Int'l. Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions, muestra la inactivación enzimática en el tabaco transgénico a través de la producción de fragmentos de anticuerpos de cadena simple.

(P) Un anticuerpo específico de virus. Véase, 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 de arresto del desarrollo producida en la naturaleza por un patógeno o un parásito. Por ende, las endo α -1,4-D poligalacturonasas fúngicas facilitan la colonización fúngica y la liberación de nutrientes de plantas solubilizando la homo- α -1,4-D-galacturonasa de la pared celular de la planta (Lamb *et al.*, 1992) *Bio/Technology* 10:1436. La clonación y la caracterización de un gen que codifica una proteína de inhibición de endopoligalacturonasa del frijol se describe en Toubart *et al.* (1992 *Plant J.* 2:367).

(R) Una proteína de arresto del desarrollo producida en la naturaleza por una planta, tal como el gen inactivador de ribosoma de cebada, que proporciona una mayor resistencia a enfermedades fúngicas (Longemann *et al.*, 1992). *Bio/Technology* 10:3305.

(S) Interferencia de ARN, en la cual una molécula de ARN se usa para inhibir la expresión de un gen blanco. En un ejemplo, una molécula de ARN es parcial o completamente de doble cadena, lo que desencadena una respuesta de silenciación, que resulta en la escisión de ARNs en ARN de interferencia pequeños, los cuales luego se incorporan en un complejo blanco que destruye los ARNm homólogos. Véase, por ejemplo, Fire *et al.*, Patente de EE.UU. 6.506.559; Graham *et al.* 6.573.099.

2. Genes que confieren resistencia a herbicidas

(A) Genes que codifican resistencia o tolerancia a un herbicida que inhibe el punto de crecimiento o meristema, tales como un herbicida de imidazalinona, sulfonanilida o sulfonilurea. Los ejemplos de genes de esta categoría codifican la acetolactato sintasa (ALS) mutante (Lee *et al.*, 1988 EMBOJ. 7:1241), también conocida como enzima ácido acetohidroxi sintasa (AHAS) (Miki *et al.*, 1990 Theor. Appl. Genet. 80:449).

(B) Uno o varios genes adicionales que codifican resistencia o tolerancia a glifosato impartida por EPSP sintasa mutante y genes *aroA*, o a través de la inactivación metabólica por 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 ciclohexandionas (genes codificadores de inhibidores de ACCasa). Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nro. 4.940.835, la cual divulga la secuencia de nucleótidos de una forma de EPSP que puede conferir resistencia al glifosato. Una molécula de ADN que codifica un gen *aroA* mutante se puede obtener bajo número de acceso ATCC 39256, y la secuencia de nucleótidos del gen mutante se divulga en la Patente de EE.UU. Nro. 4.769.061. La solicitud de patente europea Nro. 0 333 033 y la Patente de EE.UU. Nro. 4.975.374 divulgan 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 proporcionan en la solicitud europea Nro. 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 fosfinotricina acetil transferasa. Los ejemplos de genes que confieren resistencia a ácidos ariloxifenoxipropiónicos y ciclohexandionas, tales como setoxidim y haloxifop, son los genes *Accl-S1*, *Accl-S2* y *Accl-S3* descritos por Marshall *et al.* (1992) Theor. Appl. Genet. 83:435.

(C) Genes que codifican resistencia o tolerancia a un herbicida que inhibe la fotosíntesis, tales como una triazina (genes *psbA* y *gs+*) y un benzonitrilo (gen de nitrilasa). Przibilla *et al.* (1991) Célula de planta 3:169 describen el uso de plásmidos

que codifican genes *psbA* mutantes para transformar *Chlamydomonas*. Las secuencias de nucleótidos para genes de nitrilasa se divulgan en la Patente de EE.UU. Nro. 4.810.648, y las moléculas de ADN que contienen estos genes están disponibles bajo los números de acceso ATCC 53435, 67441 y 67442. La clonación y la expresión de ADN que codifica una glutatona S-transferasa se describe en Hayes *et al.* (1992) *Biochem. J.* 285:173.

(D) Genes que codifican resistencia o tolerancia a un herbicida que se une a hidroxifenilpiruvato dioxigenasas (HPPD), enzimas que catalizan la reacción en la cual para-hidroxifenilpiruvato (HPP) se transforma en homogentisato. Esto incluye herbicidas tales como isoxazoles (EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, Patente de EE.UU. Nro. 5.424.276), en particular isoxaflutol, que es un herbicida selectivo para el maíz, diquetonitrilos (EP496630, EP496631), en particular 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃ fenil)propan-1,3-diona y 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂fenil)propan-1,3-diona, tricetonas (EP625505, EP625508, Patente de EE.UU. Nro. 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 de EE.UU. Nros. 6.268.549 y 6.245.968 y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. Nro. 20030066102.

(E) Genes que codifican resistencia o tolerancia a herbicidas de fenoxi auxina, tales como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y que también pueden conferir resistencia o tolerancia a herbicidas de ariloxifenoxipropionato (AOPP). Los ejemplos de dichos genes incluyen el gen de la enzima dioxigenasa α -ketoglutarato-dependiente (*aad-1*), descrito en la Patente de EE.UU. Nro. 7.838.733.

(F) Genes que codifican resistencia o tolerancia a herbicidas de fenoxi auxina, tales como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y que también pueden conferir resistencia o tolerancia a herbicidas de piridiloxi auxina, tales como fluroxipir o triclopir. Los ejemplos de dichos genes incluyen el gen de la enzima dioxigenasa α -ketoglutarato-dependiente (*aad-12*), descrito en WO 2007/053482 A2.

(G) Genes que codifican resistencia o tolerancia a dicamba (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. Nro. 20030135879).

(H) Genes que proporcionan resistencia o tolerancia a herbicidas que inhiben la protoporfirinogeno oxidasa (PPO) (véase la Patente de EE.UU. Nro. 5.767.373).

(I) Genes que proporcionan resistencia o tolerancia a herbicidas de triazina (tales como atrazina) y herbicidas de derivados de urea (tales como diuron), que se unen a proteínas centrales de los 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) Metabolismo de ácidos grasos modificado, por ejemplo, al transformar maíz o *Brassica* con un gen antisentido o esteroil-ACP desaturasa para incrementar el contenido de ácido esteárico de la planta (Knultzon *et al.*, 1992) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:2624.

(B) Menor contenido de fitato

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

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

(C) Composición de carbohidratos modificada efectuada, por ejemplo, transformando las plantas con un gen que codifica una enzima que altera el patrón de ramificación del almidón. Los ejemplos de dichas enzimas incluyen el gen de fructosiltransferasa de *Streptococcus mucus* (Shiroza *et al.*, 1988) J. Bacteriol. 170:810, el gen de levansacarasa de *Bacillus subtilis* (Steinmetz *et al.*, 1985 Mol. Gen. Genel. 200:220), α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Pen *et al.*, 1992 Bio/Technology 10:292), genes de invertasa del tomate (Elliot *et al.*, 1993), gen de amilasa de la cebada

(Sogaard *et al.*, 1993 J. Biol. Chem. 268:22480) y enzima II de ramificación del almidón endosperma del maíz (Fisher *et al.*, 1993 Plant Physiol. 102:10450).

Transformación

Los métodos adecuados para la transformación de plantas incluyen cualquier método por el cual el ADN se pueda introducir en una célula, por ejemplo y sin limitaciones: electroporación (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nro. 5.384.253); bombardeo de micro-proyectiles (véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nros. 5.015.580, 5.550.318, 5.538.880, 6.160.208, 6.399.861 y 6.403.865); transformación mediada por *Agrobacterium* (véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nros. 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 de EE.UU. Nro. 5.508.184). Estos métodos se pueden usar para transformar establemente o para transformar transitoriamente una planta.

Se puede introducir un constructo de ADN directamente en el ADN genómico de la célula de planta usando técnicas tales como agitación con fibras de carburo de silicio (véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. Nros. 5.302.523 y 5.464.765), o los constructos de ADN se pueden introducir directamente en el tejido de la planta usando métodos biolísticos, tales como bombardeo de partículas de ADN (véase, por ejemplo, Klein *et al.*, (1987) Nature 327:70–73). Alternativamente, el constructo de ADN se puede introducir en la célula de planta a través de transformación de nanopartículas (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. Nro. 2009/0104700, incorporada a la presente por referencia en su totalidad).

Además, la transferencia de genes se puede lograr usando bacterias o virus distintos de *Agrobacterium*, tales como *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, virus X de la papa, virus mosaico del coliflor y virus mosaico de vena de mandioca y/o virus mosaico del tabaco; véase, por ejemplo, Chung *et al.* (2006) *Trends Plant Sci.* 11(1):1–4.

A través de la aplicación de técnicas de transformación, las células de virtualmente cualquier especie de planta se pueden transformar establemente, 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 del algodón se describe en las Patentes de EE.UU. Nros. 5.846.797, 5.159.135, 5.004.863 y 6.624.344; las técnicas para transformar plantas de *Brassica* en particular se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. Nro. 5.750.871; las técnicas para transformar la soja se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. Nro. 6.384.301; y las técnicas para transformar el maíz se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. Nros. 7.060.876 y 5.591.616, y la Publicación Internacional PCT WO 95/06722.

Tras efectuar la entrega de un ácido nucleico exógeno a una célula receptora, una célula transformada generalmente es identificada para cultivo y regeneración de planta adicional. A fin de mejorar la capacidad para identificar transformantes, se desea emplear un gen de marcador seleccionable con el vector de transformación usado para generar el transformante. En una forma de realización ilustrativa, una población de células transformadas se puede ensayar exponiendo las células a un agente o agentes selectivos, o las células se pueden analizar para detectar el rasgo de gen marcador deseado.

Las células que sobreviven a la exposición a un agente selectivo, o las células que han dado positivo en un ensayo de detección, se pueden cultivar en medio que soporte la regeneración de plantas. En una forma de realización, cualquier medio de cultivo tisular de plantas adecuado se puede modificar incluyendo otras sustancias, tales como reguladores del crecimiento. El tejido se puede mantener en un medio básico con reguladores del crecimiento hasta que se disponga de suficiente tejido para comenzar los esfuerzos de regeneración de la planta, o luego de repetidas rondas de selección manual, hasta que la morfología del tejido es adecuada para la regeneración (por ejemplo, al menos 2 semanas), luego se transfiere a medio conducente a la formación de brotes. Los cultivos se transfieren periódicamente hasta que se haya formado suficiente cantidad de brotes. Una vez formados los brotes, se transfieren a medio conducente a la formación de raíces. Una vez que se han formado suficientes raíces, las plantas se puede transferir a la tierra para su posterior crecimiento y maduración.

Para confirmar la presencia de un ácido nucleico deseado que comprende los constructos proporcionados en plantas regeneradas, se puede realizar una variedad de

ensayos. Dichos ensayos pueden incluir: ensayos de biología molecular, tales como Southern y Northern blotting y PCR; ensayos bioquímicos, tales como detección de la presencia de un producto de proteína, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA, western blots y/o LC–MS MS espectrofotometría) o por función enzimática; ensayos de partes de plantas, tales como ensayos de hojas o raíces; y/o análisis del fenotipo de la planta regenerada entera.

Los eventos transgénicos se pueden detectar, por ejemplo, por amplificación de PCR usando, por ejemplo, cebadores oligonucleótido específicos para las moléculas de ácido nucleico de interés. Se entiende que la genotipificación por PCR incluye, aunque no a modo de limitación, amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) del ADN genómico derivado de tejido de callos aislado de plantas huésped, que se predice que contiene una molécula de ácido nucleico de interés integrada en el genoma, seguida por clonación estándar y análisis de secuencias de productos de amplificación de PCR. Los métodos de genotipificación por PCR han sido bien descritos (véase, por ejemplo, Rios *et al.* (2002) *Plant J.* 32:243–53), y se pueden aplicar al ADN genómico derivado de cualquier especie de planta o tipo de tejido, incluidos cultivos celulares. Las combinaciones de cebadores oligonucleótidos que se unen a secuencias blanco y secuencias introducidas se pueden usar secuencialmente o en multiplex en reacciones de amplificación de PCR. Se pueden producir cebadores oligonucleótidos diseñados para fundirse en el sitio blanco, secuencias de ácido nucleico introducidas y/o combinaciones de ambos. Por lo tanto, las estrategias de genotipificación de PCR pueden incluir, por ejemplo y sin limitaciones: amplificación de secuencias específicas en el genoma de la planta; amplificación de secuencias específicas múltiples en el genoma de la planta; amplificación de secuencias no específicas en el genoma de la planta; y combinaciones de cualquiera de las anteriores. El especialista en el arte podrá diseñar combinaciones adicionales de cebadores y reacciones de amplificación para interrogar al genoma. Por ejemplo, se puede diseñar una serie de cebadores oligonucleótidos directos e inversos para fundirse a la secuencia de ácido nucleico específica para el blanco más allá de los límites de la secuencia de ácido nucleico introducida.

Los cebadores oligonucleótidos directos e inversos se pueden diseñar para fundirse específicamente a una molécula de ácido nucleico introducida, por ejemplo, en una secuencia correspondiente a una región codificadora dentro de una secuencia de nucleótidos de interés comprendida allí, u otras partes de la molécula de ácido nucleico. Los cebadores se pueden usar en conjunto con los cebadores descritos en la presente. Los cebadores oligonucleótidos se pueden sintetizar de acuerdo con una secuencia deseada y están disponibles en el comercio (por ejemplo, de Integrated ADN Technologies, Inc., Coralville, IA). La amplificación puede ir seguida por la clonación y secuenciación, o por análisis de secuencias directo de los productos de amplificación. En una forma de realización, se emplean cebadores de oligonucleótidos específicos para el gen blanco en las amplificaciones de PCR.

Método para expresar un transgen

En una forma de realización, un método para expresar al menos un transgen en una planta comprende cultivar una planta que comprende un promotor quimérico unido operativamente a al menos un transgen. En una forma de realización, un método para expresar al menos un transgen en un tejido de planta o una célula de planta comprende cultivar una planta que comprende un promotor quimérico unido operativamente a al menos un transgen. En una forma de realización, un método para expresar al menos un transgen en una planta comprende cultivar un tejido de planta o una célula de planta que comprende un promotor quimérico unido operativamente a al menos un transgen. En una forma de realización, un método para expresar al menos un transgen en un tejido de planta o una célula de planta comprende cultivar un tejido de planta o una célula de planta que comprende un promotor quimérico unido operativamente a al menos un transgen.

En una forma de realización, un método para expresar al menos un transgen en una planta comprende cultivar una planta que comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor quimérico unido operativamente a al menos un transgen.

En una forma de realización, un método para expresar al menos un transgen en un tejido de planta o una célula de planta comprende cultivar un tejido de planta o una

célula de planta que comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor quimérico unido operativamente a al menos un transgen.

En una forma de realización, una planta, tejido de planta o célula de planta comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor quimérico unido operativamente a un transgen, en donde el promotor quimérico está compuesto por un promotor corriente arriba, intrón y 5'-UTR. En una forma de realización, una planta, tejido de planta o célula de planta comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor corriente arriba, intrón y 5'-UTR. En una forma de realización, el promotor corriente arriba, intrón y 5'-UTR es un polinucleótido de SEC. ID NRO.:1. En una forma de realización, una planta, tejido de planta o célula de planta comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor corriente arriba, intrón y 5'-UTR, en donde el promotor corriente arriba, intrón y 5'-UTR es al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% o 100% idéntico a SEC. ID NRO.:1. En una forma de realización ilustrativa, una planta, tejido de planta o célula de planta comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor corriente arriba, intrón y 5'-UTR que está unido operativamente a un transgen, en donde el transgen puede ser un transgen de resistencia a insecticidas, un transgen de tolerancia a herbicidas, un transgen de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgen de eficiencia en el uso de agua, un transgen de calidad nutricional, un transgen de unión a ADN, un transgen de marcador seleccionable, o combinaciones de ellos.

En una forma de realización, una planta, tejido de planta o célula de planta comprende un casete de expresión génica que comprende una promotor quimérico unido operativamente a un transgen, en donde el promotor quimérico está compuesto por un promotor corriente arriba, intrón y 5' -UTR. El promotor corriente arriba, intrón y 5' -UTR pueden estar unidos operativamente a diferentes transgenes dentro de un casete de expresión génica cuando el casete de expresión génica incluye dos o más transgenes. En una forma de realización ilustrativa, un casete de expresión génica comprende un promotor corriente arriba, intrón y 5'-UTR que está unido operativamente a un transgen, en donde el transgen puede ser un transgen de resistencia a insecticidas, un transgen de tolerancia a

herbicidas, un transgen de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgen de eficiencia en el uso de agua, un transgen de calidad nutricional, un transgen de unión a ADN, un transgen de marcador seleccionable, o combinaciones de ellos.

En una forma de realización, la expresión del transgen usando los métodos descritos en la presente está preferentemente expresada dentro de los tejidos radiculares de la planta. En una forma de realización, la expresión del transgen incluye más de un transgen expresado en los tejidos radiculares de la planta. En una forma de realización, un método para cultivar una planta transgénica como se describe en la presente incluye la expresión del transgen preferida para la raíz. En una forma de realización, un método para expresar un transgen en un tejido de planta o una célula de planta incluye tejidos preferidos de raíz y células preferidas de raíz. En una forma de realización, la expresión preferida para la raíz incluye la expresión preferida para la raíz del maíz.

En una forma de realización, una planta, tejido de planta o célula de planta comprende un vector que comprende un elemento regulatorio promotor génico quimérico según se divulga en la presente. En una forma de realización, una planta, tejido de planta o célula de planta comprende un vector que comprende un elemento regulatorio promotor génico quimérico según se divulga en la presente unido operativamente a un transgen. En una forma de realización, una planta, tejido de planta o célula de planta comprende un vector que comprende un casete de expresión génica según se divulga en la presente. En una forma de realización, un vector puede ser un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un bacteriófago o un fragmento de virus.

En una forma de realización, una planta, tejido de planta o célula de planta de acuerdo con los métodos divulgados en la presente puede ser monocotiledónea. La planta, tejido de planta o célula de planta monocotiledónea puede ser, aunque sin limitaciones, maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, cebada, centeno, sorgo, orquídeas, bambú, banana, espadañas, lirios, avena, cebolla, mijo y triticale.

En una forma de realización, una planta, tejido de planta o célula de planta de acuerdo con los métodos divulgados en la presente puede ser dicotiledónea. La planta,

tejido de planta o célula de planta dicotiledónea puede ser, aunque sin limitaciones, colza, canola, mostaza india, mostaza etíope, soja, girasol y algodón.

Con respecto a la producción de plantas genéticamente modificadas, los métodos para la ingeniería genética de plantas son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, se han desarrollado numerosos métodos para la transformación de plantas, que incluyen protocolos de transformación biológica y física para plantas dicotiledóneas, así como 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)). Además, se dispone de vectores y métodos de cultivo *in vitro* para la transformación de células y tejidos de planta y para la regeneración 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 especialista en el arte reconocerá que, luego de que la secuencia exógena es incorporada establemente en las plantas transgénicas y se confirma que está operativa, se puede introducir en otras plantas por cruce sexual. Se puede usar cualquier de varias técnicas de cultivo estándar, dependiendo de la especie a cruzar.

Una célula de planta transformada, callo, tejido o planta se puede identificar y aislar seleccionando o detectando el material de planta modificado por ingeniería genética en busca de rasgos codificados por los genes marcadores presentes en el ADN transformante. Por ejemplo, la selección se puede realizar cultivando el material de planta modificado en medio que contiene una cantidad inhibitoria del antibiótico o herbicida al cual el constructo de gen transformante confiere resistencia. Además, las células transformadas también pueden ser identificadas por detección de las actividades de cualquier gen marcador visible (por ejemplo, los genes *yfp*, *gfp*, β -glucuronidasa, luciferasa, B o C1) que pueden estar presentes en los constructos de ácido nucleico recombinante. Dichas metodologías de selección y detección son bien conocidas por el especialista en el arte.

También se pueden usar métodos físicos y bioquímicos para identificar plantas o células de plantas transformadas que contienen constructos de genes insertados. Estos métodos incluyen, aunque no a modo de limitación: 1) análisis Southern o amplificación por PCR para detectar y determinar la estructura del inserto de ADN recombinante; 2) Northern blot, protección de S1 RNasa, extensión de cebador o amplificación por PCR de transcriptasa inversa para detectar y examinar transcritos de ARN de los constructos génicos; 3) ensayos enzimáticos para detectar actividad de enzimas o ribozimas, donde dichos productos génicos son codificados por el constructo génico; 4) análisis por secuenciación de próxima generación (NGS); 5) electroforesis en gel de proteínas, técnicas de western blot, inmunoprecipitación o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), donde los productos de constructo génico son proteínas. También se pueden usar técnicas adicionales, tales como hibridación *in situ*, tinción enzimática e inmunotinción, para detectar la presencia o expresión del constructo recombinante en órganos y tejidos específicos de las plantas. Los métodos para realizar todos estos ensayos son bien conocidos por el especialista en el arte.

Los efectos de la manipulación génica usando los métodos divulgados en la presente se pueden observar, por ejemplo, por Northern blots del ARN (por ejemplo, ARNm) aislado de los tejidos de interés. Típicamente, si el ARNm está presente o la cantidad de ARNm ha aumentado, se puede suponer que el correspondiente transgen está expresado. Se pueden usar otros métodos para medir la actividad de genes y/o polipéptidos codificados. Se pueden usar diferentes tipos de ensayos enzimáticos, dependiendo del sustrato usado y el método para detectar el aumento o la disminución de un producto o sub-producto de reacción. Además, los niveles de polipéptido expresado se pueden medir de manera inmunoquímica, es decir, por ELISA, RIA, EIA y otros ensayos basados en anticuerpos bien conocidos por el especialista en el arte, tales como ensayos de detección electroforética (ya sea con tinción o western blotting). A modo de ejemplo no limitativo, la detección de las proteínas AAD-1 (ariloxialcanoato dioxigenasa; véase WO 2005/107437) y PAT (fosfinotricin-N-acetil-transferasa) usando un ensayo ELISA se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. Nro.

20090093366, la cual se incorpora a la presente por referencia en su totalidad. El transgen se puede expresar selectivamente en algunos tipos celulares o tejidos de la planta, o en algunos estadios del desarrollo, o el transgen se puede expresar en sustancialmente todos los tejidos de la planta, sustancialmente a lo largo de todo su ciclo de vida. Sin embargo, cualquier modo de expresión combinatoria también es aplicable.

La presente divulgación también abarca las semillas de las plantas transgénicas descritas anteriormente, en donde las semillas comprenden el transgen o casete de expresión génica. La presente divulgación además abarca la progenie, clones, líneas celulares o células de las plantas transgénicas descritas antes, en donde dicha progenie, clon, línea celular o célula comprenden el transgen o constructo génico.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a métodos y formas de realización específicas, se podrá apreciar que se pueden hacer diversas modificaciones y cambios sin desviarse de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Nuevos elementos regulatorios promotores génicos quiméricos

Las secuencias de promotor quimérico consisten en una secuencia de polinucleótidos promotora corriente arriba que se obtuvo de peroxidasa 5 de *Zea mays*, seguida por alcohol deshidrogenasa (I) de *Zea mays* intrón 6 y 5'-UTR del virus de la veta del maíz. La secuencia de promotor corriente arriba de peroxidasa 5 de *Zea mays* de 1.642 bp (SEC. ID NRO.:2) se muestra subrayada. La secuencia de 5'-UTR del virus de la veta del maíz de 117 bp (también denominada secuencia líder) (SEC. ID NRO.:3) se muestra en letras minúsculas. La secuencia de alcohol deshidrogenasa (I) de *Zea mays* de 341 bp intrón 6 (SEC. ID NRO.:4) se muestra en bastardilla.

ACCACTGTTGTAACTTGTAAGCCACTAGCTCACGTTCTCCATGAGCTCTTCT
CTCTGCTGTTTCTTCCTCTGCTAACTGCGTTATGATATGACGTCGTATAAATA
ATCTCACAATACTTCCTTATTTTCAGCATGGCCTCTTTTATGTTTATTTAACA

GTAGCAACCAACGCCGCTCGATGTTTCCTTCAAGAAACGGCCACTCACTATG
TGGTGTGCAGAAGAACAAATGTAAGCAGCTCCTACAGGTACCAGTAGTCAT
GTCAGTGTGGAAGCTTTCCAACCAACGCCTCCTTCGAGGAACCTGGTCGTGC
TGACATGAATGTAGGCCATGCAAGCACAAGCACCTAACGCGAATCATCAGC
ACGCGCCGTGTACTGGGCGTTGGTACATCACACCCCGCGTTTGACCTGATCG
GAAGCATGCGTGTGTGTTGGCTGCAGGACCGGCTATAGGTTTCCTGCATTGG
ACAGCAGAAGCCAGTCATGTTAGGCACTCACGCGCTCCTGCCGTTTGATGA
ATCATCCGGTCTTTTCGTATTGATCACTAGTTCACCTACGCTGATATAGCAAAT
TTTAAGATGTGAAACCACGAGACGAGCGATAAATCTTAGACGTTACCTATC
CATATGAAGCTTGTGCGAAAAAAGGCGTGCCGCTGTAGCATCATTCGTAT
ACACTTTTGTCCCCAAAGACAGGGATACGAATCCATGCTCGACAGAACCCT
CCCTTCCCTGCAGATAACGACACTTAAGTATAACAAAAGTAGTTGGATTATT
TCAGAAGCAAAATCTCACTTTTCGCTGGCCTTTTTGTACTTTGGTTACTTGAG
TTCAGACAGTGTATGCTATATTGTCATGTGCTGCGTAAGGTTTAAATATGGT
TCGACAAATATATCAGTATATCACTACTTTGTTATGGGTGGGGCCTAGCACA
AACTTGATACAGCTAGGATAAAGTTAGAACGATGACTGATCTACTGTAAAG
CGACACCTGTCCTGTTATGGTAGTTTAAGTCCATTCCTGGACGACTCCAGAT
CCAGGATATGATGCTGTTACATAATGCGATTGTTTACAATAAAATTGCATGA
TGTTCTTCTACTCTTTAGGCAGTTTTGTTCAACAGGCAAGTTGCATAATGCAT
GTGCATATATGAGCAGCATAATCATCAATTAATCATAGGTTTCGTATTTTAG
TTTCACTCCTTCACATTATTCCAGCCCTTGAAGAAAAATGTAGCAGTGCTTG
CTGTTTAATAAGTGGCAGAGCTGTTTTCACTCCACCTACGCTTGTCTAGGAC
CAAAATTTTAATCTGTCACTTTGAGCTAAAACTGAAGCACCAAACCGCTACA
AAAGAACGTAGGAGCTGAATTGTAACCTTGATGGGATTACTATAGCAGTTGC
TACAGTTCTAGCTAGCTACCTTATTCTATACGCATCACCTAACAACCCGGC
TGACTGCTGCATCTGACCCACCGTCCCCTGCTCCAAACCAACTCTCCTTTC
CTTGATGCACTACACCCACTTCCTGCAGCTATATATAACCACCATATGCCCA
TCTTATGAAACCATCCACAAGAGGAGAAGAAACAATCAACCAGCAACACTC
TTCTCTTATAACATAGTACAGCGAAGGTAACCTCACGGTACCctgaaggctcgacaagg

cagtccacggaggagctgatatttggtggacaagctgtggataggagcaaccctatccctaataataccagcaccaccaagtca
 gggcaatccccagatcaCCCCAGCAGATTTCGAAGAAGGTACAGTACACACACATGTATA
 TATGTATGATGTATCCCTTCGATCGAAGGCATGCCTTGGTATAATCACTGAGTAGT
 CATTTTATTACTTTGTTTTGACAAGTCAGTAGTTCATCCATTTGTCCCATTTTTTCAG
 CTTGGAAGTTTGGTTGCACTGGCCTTGGTCTAATAACTGAGTAGTCATTTTATTAC
 GTTGTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCATTTTTTCAGCTAGGAAGT
 TTGGTTGCACTGGCCTTGGACTAATAACTGATTAGTCATTTTATTACATTGTTTCGA
 CAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCATTTTTTCAGCTAGGAAGTTCGGATCTG
 GGGCCATTTGTTCCAGGCACGGGATAAGCATTCAG (SEC. ID NRO.:1)

Ejemplo 2: Diseño de constructo

A menos que se indique lo contrario, las manipulaciones moleculares biológicas y bioquímicas descritas en este ejemplo y en ejemplos subsiguientes se realizaron mediante metodologías estándar según se divulga, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (1995) y Sambrook *et al.* (1989), y sus actualizaciones. Los constructos usados en los experimentos (TABLA 1) se describen en mayor detalle a continuación.

El constructo pDAS5144 (por ejemplo, pDAB3620) se construyó de modo que contenga dos casetes de expresión génica. El primer casete de expresión génica (SEC. ID NRO.:5) contenía el promotor corriente arriba de peroxidasa 5 de *Zea mays* (Solicitud de Patente Internacional Nro. 1998/056921), seguido por el intrón 6 de alcohol deshidrogenasa (I) de *Zea mays* (Dennis *et al.*, (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:3983–4000) y 5'–UTR del virus de la veta del maíz (Mullineaux *et al.*, (1984) *EMBO J.* 3:3063–3068) unido operativamente al transgen *tcdA* (Solicitud de Patente de EE.UU. Nro. 2009/0221501) y flanqueado por la 3'–UTR de peroxidasa 5 de *Zea mays* (Solicitud de Patente Internacional Nro. 1998/056921). El segundo casete de expresión génica contenía un gen de marcador seleccionable y se consistió en el promotor de actina de *Oryza sativa* (Patente de EE.UU. Nro. 6.429.357) unido operativamente a un transgen de *fosfinotricina acetil transferasa* (Wohlleben *et al.*, (1988) *Gene* 70: 25–37) y terminado por la 3'–UTR de lipasa de *Zea mays* (Patente de EE.UU. Nro. 7.179.902).

Este constructo se movilizó en el vector binario pSB1 Superbinario (Japan Tobacco, Tokio, JP). Los constructos usados para completar pDAS5144 se confirmaron molecularmente a través de digestión de enzimas de restricción y secuenciación de ADN.

TACAAAAAAGCAGGCTCCGCAAGCTTGCATGCCTGCAGATCCCCGGGGATC
TCCGCGGGGGCCCCACCACTGTTGTAAGCTTGTAAAGCCACTAGCTCACGTTCTC
CATGAGCTCTTCTCTCTGCTGTTTCTTCTCTGCTAACTGCGTTATGATATGA
CGTCGTATAAATAATCTCACAATACTTCCTTATTTTCAGCATGGCCTCTTTTA
TGTTTATTTAACAGTAGCAACCAACGCCGCTCGATGTTTCCTTCAAGAAACG
GCCACTCACTATGTGGTGTGCAGAAGAACAATGTAAGCAGCTCCTACAGG
TACCAGTAGTCATGTCAGTGTGGAAGCTTTCCAACCAACGCCTCCTTCGAGG
AACCTGGTCGTGCTGACATGAATGTAGGCCATGCAAGCACAAGCACCTAAC
GCGAATCATCACGACGCGCCGTGTACTGGGCGTTGGTACATCACACCCCGC
GTTTGACCTGATCGGAAGCATGCGTGTGTGTTGGCTGCAGGACCGGCTATA
GGTTTCCTGCATTGGACAGCAGAAGCCAGTCATGTTAGGCACTCACGCGCTC
CTGCCGTTTGATGAATCATCCGGTCTTTCGTATTGATCACTAGTTCACTACGC
TGATATAGCAAATTTTAAGATGTGAAACCACGAGACGAGCGATAAATCTTA
GACGTTACCTATCCATATGAAGCTTGTGCGAAAAAAGGCGTGCCGCTGTA
GCATCATTCGTATACACTTTTGTCCCCAAAGACAGGGATACGAATCCATGCT
CGACAGAACCCTCCCTTCCCTGCAGATAACGACACTTAAGTATAACAAAAG
TAGTTGGATTATTTTCAAGCAAAATCTCACTTTTCGCTGGCCTTTTTGTACT
TTGGTTACTTGAGTTCAGACAGTGTATGCTATATTGTCATGTGCTGCGTAAG
GTTTAAATATGGTTCGACAAATATATCAGTATATCACTACTTTGTTATGGGT
GGGGCCTAGCACAACTTGATACAGCTAGGATAAAGTTAGAACGATGACTG
ATCTACTGTAAAGCGACACCTGTCCTGTTATGGTAGTTTAAGTCCATTCTG
GACGACTCCAGATCCAGGATATGATGCTGTTACATAATGCGATTGTTCACAA
TAAAATTGCATGATGTTCTTCTACTCTTTAGGCAGTTTTGTTCAACAGGCAA
GTTGCATAATGCATGTGCATATATGAGCAGCATAATCATCAATTAATCATAG
GTTTCGTCATTTTAGTTTCACTCCTTCACATTATTCCAGCCCTTGAAGAAAAAT

GTAGCAGTGCTTGCTGTTTAATAAGTGGCAGAGCTGTTTTCACTCCACCTAC
GCTTGTCTAGGACCAAAATTTTAATCTGTCACTTTGAGCTAAAACTGAAGCA
CCAAACCGCTACAAAAGAACGTAGGAGCTGAATTGTAAC TTGATGGGATTA
CTATAGCAGTTGCTACAGTTCTAGCTAGCTACCTTATTCTATACGCATCACC
CTAACAACCCGGCTGACTGCTGCATCTGACCCACCGTCCCCTGCTCCAAAC
CAACTCTCCTTTTCCTTGCATGCACTACACCCACTTCCTGCAGCTATATATACC
ACCATATGCCCATCTTATGAAACCATCCACAAGAGGAGAAGAAACAATCAA
CCAGCAACACTCTTCTCTTATAACATAGTACAGCGAAGGTAAC TCACGGTAC
CCTGAAGGCTCGACAAGGCAGTCCACGGAGGAGCTGATATTTGGTGGACAA
GCTGTGGATAGGAGCAACCCTATCCCTAATATACCAGCACCACCAAGTCAG
GGCAATCCCCAGATCACCCAGCAGATTCGAAGAAGGTACAGTACACACAC
ATGTATATATGTATGATGTATCCCTTCGATCGAAGGCATGCCTTGGTATAAT
CACTGAGTAGTCATTTTATTACTTTGTTTTGACAAGTCAGTAGTTCATCCATT
TGTCCCATTTTTTCAGCTTGGAAGTTTGGTTGCACTGGCACTTGGTCTAATAA
CTGAGTAGTCATTTTATTACGTTGTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCT
GTCCCATTTTTTCAGCTAGGAAGTTTGGTTGCACTGGCCTTGGACTAATAAC
TGATTAGTCATTTTATTACATTGTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGT
CCCATTTTTTCAGCTAGGAAGTTCGGATCTGGGGCCATTTGTTCCAGGCACGG
GATAAGCATTTCAGCCATGGCTAATGAGTCAGTCAAGGAGATCCCGGATGTT
CTCAAATCCCAGTGTGGTTTCAACTGCCTCACGGACATCTCCCACAGCTCAT
TCAATGAGTTCCGCCAGCAAGTCTCTGAGCACCTCTCATGGTTCGGAGACGC
ATGACCTCTACCACGATGCTCAGCAAGCCCAGAAAGACAACCGGCTGTATG
AGGCACGGATCCTCAAGAGGGCCAACCCGCAGCTCCAGAATGCGGTCCACC
TCGCCATCCTTGCTCCAAATGCGGAATTGATTGGCTACAATAACCAATTCTC
GGGAAGGGCCTCACAGTATGTTGCGCCTGGCACAGTTTCGTCCATGTTTCAGC
CCAGCAGCGTACCTCACAGAGCTGTACAGAGAGGCGAGGAACCTTCATGCG
TCTGACTCCGTGTACTATCTGGACACACGCAGACCGGACCTGAAGTCAATG
GCCCTCAGCCAGCAAAACATGGACATTGAACTGTCCACCCTTTTCCTTGAGCA
ATGAGCTTCTGTTGGAATCCATCAAGACTGAGAGCAAGCTGGAAAAC TACA

CAAAGGTGATGGAGATGCTGTCCACCTTCAGACCATCTGGAGCGACTCCAT
ACCACGATGCCTATGAGAATGTGAGGGAGGTCATTGAGCTTCAAGACCCTG
GCCTTGAGCAGCTCAATGCCAGCCCAGCCATTGCGGGACTGATGCACCAAG
CCTCCCTGCTTGGGATCAATGCCTCCATCAGCCCTGAGCTGTTCAACATCTT
GACTGAAGAGATCACTGAGGGCAATGCGGAGGAACTGTACAAGAAAACT
TCGGCAACATTGAGCCTGCCAGCCTTGCAATGCCGGAATACCTGAAACGCT
ATTACAACCTTGTTCGGATGAGGAACTTTTCGCAGTTCATTGGCAAAGCCTCAAA
CTTTGGGCAGCAAGAGTACAGCAACAATCAGCTCATCACACCTGTTGTGAA
CTCATCTGATGGCACTGTGAAGGTTTACCGCATCACAAGGGAGTACACCAC
AAATGCCTACCAGATGGATGTTGAACTGTTCCCGTTTGGAGGTGAAAATA
CCGGCTTGACTACAAGTTCAAGAACTTCTACAATGCATCCTACCTGTCGATC
AAGCTGAACGACAAACGGGAGCTTGTGAGGACGGAAGGTGCTCCCCAAGT
GAACATTGAATACTCTGCCAACATCACACTCAACACAGCGGACATCAGCCA
GCCGTTTGAAATTGGCTTGACCAGAGTGCTTCCCTCGGGCTCCTGGGCCTAT
GCGGCAGCCAAGTTTACGGTTGAGGAGTACAACCAGTACAGCTTCCTCCTG
AAGCTCAACAAGGCAATCCGGCTGAGCAGAGCCACTGAGCTGTCACCCACC
ATCCTGGAGGGCATTGTGAGGTCTGTCAACCTTCAGCTTGACATCAAACTG
ATGTGCTTGGCAAGGTGTTCCCTGACCAAGTATTACATGCAGCGCTATGCCAT
CCATGCGGAGACGGCACTGATCCTCTGCAATGCACCCATATCGCAGCGCTC
GTATGACAACCAGCCCAGCCAGTTCGACAGACTCTTCAAACTCCCCTTCTG
AACGGCCAGTACTTCAGCACTGGAGATGAAGAGATTGACCTGAACTCTGGC
TCGACGGGTGACTGGAGGAAAACCATCTTGAAGAGGGCCTTCAACATTGAT
GACGTTTCCCTCTTCCGCCTTTTGAAGATCACAGATCACGACAACAAGGATG
GCAAGATCAAGAACAATCTCAAGAACCTTTCCAACCTCTACATTGGCAAAC
TGCTTGCAGACATCCACCAGCTGACCATTGATGAGTTGGACCTGTTGCTGAT
TGCAGTTGGTGAGGGCAAGACCAACCTCTCTGCAATCTCAGACAAACAGTT
GGCAACCCTCATCCGCAAGCTGAACACGATCACAAGCTGGCTTCACACGCA
GAAGTGGTCTGTTTTCCAACCTGTTTCATCATGACCAGCACGTCCTACAACAAG
ACCCTGACTCCGGAGATCAAGAACCTTTTGGATACAGTCTATCATGGTCTCC

AAGGCTTTGACAAGGACAAGGCGGACCTGCTTCATGTCATGGCACCCCTACA
TTGCAGCCACACTCCAGCTCTCCTCTGAAAATGTTGCCCACTCAGTGCTGTT
GTGGGCTGACAAGCTCCAGCCTGGGGATGGAGCCATGACTGCTGAGAAGTT
CTGGGACTGGCTCAACACGAAGTACACACCTGGCTCCTCTGAGGCAGTTGA
GACTCAAGAACACATTGTGCAGTACTGCCAAGCGCTTGACAGTTGGAGAT
GGTTTACCACTCAACTGGCATCAACGAGAATGCCTTCCGCCTCTTTGTCACA
AAGCCTGAGATGTTTGGTGCTGCCACTGGAGCCGCTCCTGCCCATGATGCCC
TGTCACTCATCATGTTGACGAGGTTTGCAGACTGGGTCAACGCCCTTGGTGA
GAAAGCCTCGTCTGTCCTGGCAGCCTTTGAAGCCAACCTCCCTGACTGCGGAA
CAGCTTGCGGATGCCATGAACCTTGATGCCAACTTGCTCCTGCAAGCTTCGA
TCCAAGCCCAGAACCATCAGCATTTGCCACCTGTCACGCCTGAAAATGCGTT
CTCATGCTGGACCTCCATCAACACCATACTCCAGTGGGTGAACGTGGCGCA
ACAGCTCAATGTGGCACCTCAAGGAGTGTGACGCGCTGGTTGGGCTTGACTA
CATCCAGTCCATGAAGGAGACACCGACCTACGCGCAGTGGGAGAATGCAGC
TGGCGTCTTGACAGCTGGTCTGAACTCACAGCAAGCCAACACGCTGCATGC
GTTCTTGGATGAGAGCCGCTCTGCTGCCCTCAGCACGTACTATATCCGGCAA
GTTGCCAAGGCAGCGGCTGCCATCAAGTCTCGGGATGACCTCTACCAGTAC
TTGCTCATTGACAATCAGGTTTCTGCTGCCATCAAAACGACCCGGATTGCTG
AGGCCATAGCCAGCATCCAGCTCTACGTCAACAGAGCGCTTGAGAACGTTG
AAGAGAATGCCAACTCTGGAGTGATTTCTCGCCAGTTTTTCATAGACTGGGA
CAAGTACAACAAGCGCTACTCCACCTGGGCTGGGGTCTCTCAGCTTGTCTAC
TATCCTGAGAACTACATAGATCCGACGATGCGGATTGGCCAGACCAAGATG
ATGGATGCCCTCCTTCAGTCGGTGTCCCAGAGCCAGCTCAATGCTGACACTG
TGGAGGATGCCTTCATGAGCTACCTCACCTCCTTCGAGCAAGTTGCCAACCT
CAAGGTCATCTCTGCTTACCACGACAACATCAACAATGACCAAGGGCTCAC
CTACTTCATTGGCCTGTCTGAAACTGATGCGGGTGAGTATTACTGGCGCTCA
GTGGACCACAGCAAGTTCAACGATGGCAAGTTTGCTGCAAATGCCTGGTCT
GAGTGGCACAAGATTGACTGCCCCATCAACCCGTACAAGTCCACCATCAGA
CCTGTCATCTACAAGAGCCGCTTGTAAGTCTGCTCTGGCTTGAGCAGAAGGAAA

TCACGAAGCAGACTGGCAACTCCAAAGATGGCTACCAGACTGAGACGGACT
ACCGCTATGAGTTGAACTTGCTCACATCCGCTATGATGGTACATGGAACAC
TCCGATAACGTTTGATGTGAACAAGAAGATTTTCGGAGCTGAAACTGGAGAA
GAACAGAGCGCCTGGGCTCTACTGTGCTGGCTACCAAGGGGAAGATACGCT
GTTGGTGATGTTCTACAACCAGCAAGACACCCTTGACTCGTACAAGAACGC
TTCCATGCAAGGCCTCTACATCTTTGCTGACATGGCTTCCAAAGACATGACT
CCGGAGCAGAGCAATGTCTACCGGGACAACCTCCTACCAGCAATTTGACACC
AACAATGTTTCGGAGGGTCAATAACCGCTATGCGGAAGATTATGAGATCCCA
AGCTCAGTGTCTAGCCGCAAGGACTATGGCTGGGGAGACTACTATCTCAGC
ATGGTGTACAATGGTGACATACCCACGATCAACTACAAGGCTGCCTCCTCA
GACCTGAAGATATACATCAGCCCCAAGCTCCGCATCATTACAATGGCTAT
GAGGGCCAGAAGAGGAACCAAGTGCAACTTGATGAACAAGTATGGCAAAC
TGGGGACAAGTTCATTGTCTACACCTCGCTTGGTGTGAACCCGAACAATTCC
TCGAACAAGCTCATGTTCTACCCGGTCTACCAGTACAGCGGCAACACCTCTG
GCTTGAACCAAGGGAGGCTCCTGTTCCACAGAGACACCACGTACCCGAGCA
AGGTGGAGGCGTGGATTCTGCTGGTGCCAAAAGGTCCTCACCAACCAGAATG
CAGCCATTGGTGATGACTATGCCACAGACAGCCTGAACAAGCCTGATGACC
TGAAGCAGTACATCTTCATGACTGACTCCAAGGGCACAGCCACTGATGTGT
CTGGTCCGGTGGAGATCAACACTGCAATCAGCCCAGCCAAGGTCCAAATCA
TTGTCAAAGCTGGTGGCAAGGAACAGACCTTCACAGCTGACAAAGATGTGA
GCATCCAGCCAAGCCCCTCCTTTGATGAGATGAACTACCAGTTCAACGCTCT
TGAAATTGATGGCTCGGGACTCAACTTCATCAACAATTCGGCTTCAATTGAT
GTGACGTTCACTGCCTTTGCGGAGGATGGGAGGAAATTGGGCTATGAGAGC
TTCTCAATACCAGTCACCTTGAAGGTTTCCACTGACAATGCACTCACGCTTC
ATCACAACGAGAATGGAGCGCAGTACATGCAATGGCAGAGCTACCGCACA
AGGTTGAACACCCTCTTTGCAAGGCAACTTGTGGCCAGAGCCACGACTGGC
ATTGACACCATACTCAGCATGGAAACGCAGAACATCCAAGAGCCACAGTTG
GGCAAGGGTTTCTATGCCACCTTTGTGATCCCACCCTACAACCTGTCAACGC
ATGGTGATGAGCGCTGGTTCAAGCTGTACATCAAGCACGTGGTTGACAACA

ATTCCCACATCATATACTCGGGTCAGCTCACTGACACGAACATCAACATCAC
CCTGTTTCATCCCCTTGATGACGTTCCCCTGAACCAAGACTACCATGCCAAG
GTCTACATGACCTTCAAGAAATCACCGTCAGATGGCACCTGGTGGGGACCG
CACTTCGTTTCGGGATGACAAAGGCATTGTCACAATCAACCCCAAGTCCATA
CTCACCCACTTTGAGTCTGTGAATGTTCTGAATAACATCTCCTCAGAGCCGA
TGGACTTCTCGGGTGCCAACTCCCTGTACTTCTGGGAGTTGTTCTATTACAC
GCCGATGCTTGTGGCGCAGAGGTTGCTCCATGAACAGAACTTTGATGAGGC
CAACCGCTGGCTCAAGTATGTCTGGAGCCCCTCGGGTTACATTGTGCATGGC
CAGATCCAGAACTACCAATGGAATGTTGCCCCATTGCTTGAGGACACCTCCT
GGAACCTTGACCCCCTTGACTCGGTGGACCCTGATGCGGTGGCTCAGCATG
ACCCCATGCACTACAAGGTCTCAACCTTCATGAGGACCCTGGACCTTCTGAT
TGCCAGAGGAGACCATGCTTACCGCCAATTGGAACGGGACACACTGAATGA
GGCAAAGATGTGGTACATGCAAGCTCTGCACCTCTTGGGAGACAAGCCGTA
CCTCCCGCTCAGCACCATGGTCAGACCCAAGGTTGGACAGAGCAGCTGA
CATCACAACCTCAGAATGCTCATGACTCTGCCATTGTGGCTCTGAGGCAGAAC
ATCCCAACACCTGCGCCACTGTCGCTGAGATCTGCGAACACCCTGACAGAC
CTGTTCTCCCCCAGATCAATGAGGTCATGATGAACTACTGGCAAACCTTGG
CGCAGCGGGTCTACAACCTCCGCCACAACCTCTCCATTGATGGGCAGCCGCT
GTACCTCCCAATCTATGCCACACCAGCTGACCCAAAGGCGCTTCTCAGCGCA
GCTGTGGCCACGAGCCAAGGGGGAGGCAAGCTCCCTGAGAGCTTCATGTGC
CTCTGGAGGTTTCCCCACATGTTGGAGAATGCCAGAGGCATGGTGAGCCAA
CTGACTCAGTTTGGCTCGACGCTCCAGAACATCATTGAGAGGCAAGATGCA
GAGGCTCTGAATGCGTTGCTCCAGAATCAAGCAGCTGAGTTGATCCTGACG
AACCTGTCAATCCAAGACAAGACCATTGAGGAACTTGATGCGGAAAAGACA
GTCCTTGAAAAGAGCAAGGCTGGAGCCCAAAGCCGGTTCGACTCATATGGC
AAGCTGTATGATGAGAACATCAATGCTGGGGAGAATCAAGCCATGACCCTG
AGGGCTTCAGCAGCGGGTCTGACCACGGCAGTGCAAGCGTCTCGCTTGGCT
GGGGCTGCGGCTGACCTCGTTCCCAACATCTTTGGGTTTGCTGGTGGCGGAT
CAAGGTGGGGAGCCATTGCAGAAGCAACGGGCTATGTGATGGAGTTCTCTG

CCAATGTCATGAACACTGAGGCAGACAAAATCAGCCAATCGGAGACCTACA
GACGGAGACGGCAAGAATGGGAGATACAAAGGAACAATGCAGAGGCAGAA
CTGAAGCAAATAGATGCCCAACTGAAGTCCTTGGCTGTCAGAAGGGAGGCT
GCGGTCCTCCAAAAGACCTCCCTCAAGACCCAGCAAGAGCAAACCCAGTCC
CAGTTGGCGTTCCTCCAGAGGAAGTTCTCGAACCAAGCGCTGTACAACTGG
CTGAGGGGAAGGTTGGCAGCCATCTACTTCCAGTTCTATGACCTTGCTGTGG
CCAGATGCCTCATGGCGGAACAAGCCTACCGCTGGGAACTGAATGATGACT
CTGCCAGATTCATCAAACCGGGTGCATGGCAAGGCACATATGCTGGACTCC
TTGCTGGGGAGACACTCATGCTCTCATTGGCCCAGATGGAGGATGCTCACCT
CAAACGGGACAAGAGGGGCTCTGGAAGTGGAGCGGACAGTCAGCCTTGCGG
AGGTCTATGCGGGACTGCCCAAAGACAATGGACCATTTTCGTTGGCGCAAG
AGATAGACAAGTTGGTCAGCCAAGGGTCTGGATCAGCGGGTTCTGGAAACA
ACAATCTGGCGTTCGGTGCTGGCACTGACACCAAGACGTCCCTCCAAGCCTC
AGTCTCCTTTGCTGACCTGAAGATAAGGGAGGACTACCCAGCGTCCCTTGG
GAAGATCAGACGCATCAAGCAGATTTTCAGTGACCCTGCCAGCTCTTCTGGG
TCCATACCAAGATGTTCAAGCGATCCTCTCCTATGGGGACAAGGCTGGTTTG
GCGAATGGCTGTGAGGCCCTTGCTGTGTCACATGGCATGAATGACTCTGGG
CAGTTCCAGCTTGATTTCAACGATGGCAAGTTCCTGCCATTCGAGGGCATAG
CCATTGATCAAGGCACCCTGACCCTCTCCTTCCCCAATGCTTCGATGCCAGA
GAAGGGAAAACAAGCCACCATGCTCAAGACCCTGAATGATATCATACTCCA
CATCCGCTACACCATCAAGTGAGTAGTTAGCTTAATCACCTAGAGCTCGTTT
AAACTGAGGGCACTGAAGTCGCTTGATGTGCTGAATTGTTTGTGATGTTGGT
GGCGTATTTTGTTTAAATAAGTAAGCATGGCTGTGATTTTATCATATGATCG
ATCTTTGGGGTTTTATTTAACACATTGTAAAATGTGTATCTATTAATAACTCA
ATGTATAAGATGTGTTTATTCTTCGGTTGCCATAGATCTGCTTATTTGACCTG
TGATGTTTTGACTCCAAAAACCAAAATCACAACTCAATAAACTCATGGAAT
ATGTCCACCTGTTTCTTGAAGAGTTCATCTACCATTCAGTTGGCATTATCA
GTGTTGCAGCGGCGCTGTGCTTTGTAACATAACAATTGTTACGGCATATATC
CAACGGCCGGCCTAGGCCACGGTGGCCAGATCCACTAGAGGCGCGCCTCTA

GTTCTAGAGCGGCCGCTTAATTCACCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACT
 GGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTT
 CGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACA
 GTTGCAAATGGCGCGCCGACCCAGCTTTC (SEC. ID NRO.:5)

El constructo pDAS5128 (por ejemplo, pDAB3619) se construyó de modo que contuviera dos casetes de expresión génica. El primer casete de expresión génica (SEC. ID NRO.:6) contenía el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays* (Christensen *et al.*, (1992) *Plant Molecular Biology* 18; 675–689) seguido por el intrón 6 de alcohol deshidrogenasa (I) de *Zea mays* (Dennis *et al.*, (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:3983–4000) y 5'–UTR del virus de la veta del maíz (Mullineaux *et al.*, (1984) *EMBO J.* 3:3063–3068) unido operativamente al transgen *tcdA* (Solicitud de Patente de EE.UU. Nro. 2009/0221501) y flanqueado por la 3'–UTR de peroxidasa 5 de *Zea mays* (Solicitud de Patente Internacional Nro. 1998/056921). El segundo casete de expresión génica contenía un gen de marcador seleccionable y consistía en el promotor de actina de *Oryza sativa* (Patente de EE.UU. Nro. 6.429.357) unido operativamente a un transgen de *fosfinotricina acetil transferasa* (Wohlleben *et al.*, (1988) *Gene* 70: 25–37) y terminado por la 3'–UTR de lipasa de *Zea mays* (Patente de EE.UU. Nro. 7.179.902). Este constructo fue inmovilizado en el vector binario pSB1 Superbinario (Japan Tobacco, Tokio, JP). Los constructos usados para completar pDAS5128 fueron confirmados molecularmente por digestión de enzimas de restricción y secuenciación de ADN. El nuevo promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays*, seguido por el intrón 6 de alcohol deshidrogenasa (I) de *Zea mays* y 5'–UTR del virus de la veta del maíz, se divulga en la presente como SEC. ID NRO.:7.

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGT
 CTAAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTGTACACTTGTTTGAAGTGC
 AGTTTATCTATCTTTATACATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAAT
 CTATAGTACTACAATAATATCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGT
 TAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGACTCTACAGT

TTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCT
ATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAAT
GGTTTTTATAGACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCT
AAATTAAGAAAACATAAACTCTATTTTAGTTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATA
TAAAATAGAATAAAAATAAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGA
AATTAAAAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGC
CTGTTAAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAG
CGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCT
CTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGG
CATCCAGAAATTGCGTGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGC
GGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTTCCTTTCCAC
CGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTCC
ACACCCTCTTTCCCCAACCTCGTGTTGTTTCGGAGCGCACACACACAACCA
GATCTCCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGGGTACCCTGAAG
GCTCGACAAGGCAGTCCACGGAGGAGCTGATATTTGGTGGACAAGCTGTGG
ATAGGAGCAACCCTATCCCTAATATACCAGCACCAAGTCAGGGCAATC
CCCAGATCACCCCAGCAGATTCTGAAGAAGGTACAGTACACACACATGTATA
TATGTATGATGTATCCCTTCGATCGAAGGCATGCCTTGGTATAATCACTGAG
TAGTCATTTTATTACTTTGTTTTGACAAGTCAGTAGTTCATCCATTTGTCCCA
TTTTTTCAGCTTGGAAGTTTGTTGCACTGGCACTTGGTCTAATAACTGAGT
AGTCATTTTATTACGTTGTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCAT
TTTTTCAGCTAGGAAGTTTGTTGCACTGGCCTTGGACTAATAACTGATTAG
TCATTTTATTACATTGTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCATTT
TTCAGCTAGGAAGTTTCGGATCTGGGGCCATTTGTTCCAGGCACGGGATAAG
CATTCAGCCATGGCTAATGAGTCAGTCAAGGAGATCCCGGATGTTCTCAAA
TCCCAGTGTGGTTTCAACTGCCTCACGGACATCTCCCACAGCTCATTCAATG
AGTTCGGCCAGCAAGTCTCTGAGCACCTCTCATGGTCGGAGACGCATGACCT
CTACCACGATGCTCAGCAAGCCCAGAAAGACAACCGGCTGTATGAGGCAGC
GATCCTCAAGAGGGCCAACCCGCAGCTCCAGAATGCGGTCCACCTCGCCAT

CCTTGCTCCAAATGCGGAATTGATTGGCTACAATAACCAATTCTCGGGAAG
GGCCTCACAGTATGTTGCGCCTGGCACAGTTTCGTCCATGTTTCAGCCCAGCA
GCGTACCTCACAGAGCTGTACAGAGAGGCGAGGAACCTTCATGCGTCTGAC
TCCGTGTACTATCTGGACACACGCGAGACCGGACCTGAAGTCAATGGCCCTC
AGCCAGCAAAACATGGACATTGAACTGTCCACCCTTTTCCTTGAGCAATGAG
CTTCTGTTGGAATCCATCAAGACTGAGAGCAAGCTGGAAAACCTACACAAAG
GTGATGGAGATGCTGTCCACCTTCAGACCATCTGGAGCGACTCCATACCAC
GATGCCTATGAGAATGTGAGGGAGGTCATTTCAGCTTCAAGACCCTGGCCTT
GAGCAGCTCAATGCCAGCCCAGCCATTGCGGGACTGATGCACCAAGCCTCC
CTGCTTGGGATCAATGCCTCCATCAGCCCTGAGCTGTTCAACATCTTGACTG
AAGAGATCACTGAGGGCAATGCGGAGGAACTGTACAAGAAAAACTTCGGC
AACATTGAGCCTGCCAGCCTTGCAATGCCGGAATACCTGAAACGCTATTAC
AACTTGTCGGATGAGGAACTTTCGCAGTTCATTGGCAAAGCCTCAAACCTTG
GGCAGCAAGAGTACAGCAACAATCAGCTCATCACACCTGTTGTGAACTCAT
CTGATGGCACTGTGAAGGTTTACCGCATCACAAGGGAGTACACCACAAATG
CCTACCAGATGGATGTTGAACTGTTCCCGTTTGGAGGTGAAAACCTACCGGCT
TGACTACAAGTTCAAGAACTTCTACAATGCATCCTACCTGTCGATCAAGCTG
AACGACAAACGGGAGCTTGTGAGGACGGAAGGTGCTCCCCAAGTGAACATT
GAATACTCTGCCAACATCACACTCAACACAGCGGACATCAGCCAGCCGTTT
GAAATTGGCTTGACCAGAGTGCTTCCCTCGGGCTCCTGGGCCTATGCGGCAG
CCAAGTTTACGGTTGAGGAGTACAACCAGTACAGCTTCCTCCTGAAGCTCA
ACAAGGCAATCCGGCTGAGCAGAGCCACTGAGCTGTCACCCACCATCCTGG
AGGGCATTGTGAGGTCTGTCAACCTTCAGCTTGACATCAACACTGATGTGCT
TGGCAAGGTGTTCCCTGACCAAGTATTACATGCAGCGCTATGCCATCCATGCG
GAGACGGCACTGATCCTCTGCAATGCACCCATATCGCAGCGCTCGTATGAC
AACCAGCCCAGCCAGTTCGACAGACTCTTCAACACTCCCCTTCTGAACGGCC
AGTACTTCAGCACTGGAGATGAAGAGATTGACCTGAACTCTGGCTCGACGG
GTGACTGGAGGAAAACCATCTTGAAGAGGGCCTTCAACATTGATGACGTTT
CCCTCTTCCGCCTTTTGAAGATCACAGATCACGACAACAAGGATGGCAAGA

TCAAGAACAATCTCAAGAACCTTTCCAACCTCTACATTGGCAAACCTGCTTGC
AGACATCCACCAGCTGACCATTGATGAGTTGGACCTGTTGCTGATTGCAGTT
GGTGAGGGCAAGACCAACCTCTCTGCAATCTCAGACAAACAGTTGGCAACC
CTCATCCGCAAGCTGAACACGATCACAAGCTGGCTTCACACGCAGAAGTGG
TCTGTTTTTCCAACCTGTTTCATCATGACCAGCACGTCCTACAACAAGACCCTGA
CTCCGGAGATCAAGAACCTTTTGGATACAGTCTATCATGGTCTCCAAGGCTT
TGACAAGGACAAGGCGGACCTGCTTCATGTCATGGCACCTTACATTGCAGC
CACACTCCAGCTCTCCTCTGAAAATGTTGCCCACTCAGTGCTGTTGTGGGCT
GACAAGCTCCAGCCTGGGGATGGAGCCATGACTGCTGAGAAGTTCTGGGAC
TGGCTCAACACGAAGTACACACCTGGCTCCTCTGAGGCAGTTGAGACTCAA
GAACACATTGTGCAGTACTGCCAAGCGCTTGACACAGTTGGAGATGGTTTAC
CACTCAACTGGCATCAACGAGAATGCCTTCCGCCTCTTTGTCACAAAGCCTG
AGATGTTTGGTGCTGCCACTGGAGCCGCTCCTGCCCATGATGCCCTGTCACT
CATCATGTTGACGAGGTTTGCAGACTGGGTCAACGCCCTTGGTGAGAAAGC
CTCGTCTGTCTTGGCAGCCTTTGAAGCCAACTCCCTGACTGCGGAACAGCTT
GCGGATGCCATGAACCTTGATGCCAACTTGCTCCTGCAAGCTTCGATCCAAG
CCCAGAACCATCAGCATTTGCCACCTGTCACGCCTGAAAATGCGTTCTCATG
CTGGACCTCCATCAACACCATACTCCAGTGGGTGAACGTGGCGCAACAGCT
CAATGTGGCACCTCAAGGAGTGTGACGCGCTGGTTGGGCTTGACTACATCCA
GTCCATGAAGGAGACACCGACCTACGCGCAGTGGGAGAATGCAGCTGGCGT
CTTGACAGCTGGTCTGAACTCACAGCAAGCCAACACGCTGCATGCGTTCTTG
GATGAGAGCCGCTCTGCTGCCCTCAGCACGTACTATATCCGGCAAGTTGCCA
AGGCAGCGGCTGCCATCAAGTCTCGGGATGACCTCTACCAGTACTTGCTCAT
TGACAATCAGGTTTCTGCTGCCATCAAAACGACCCGGATTGCTGAGGCCAT
AGCCAGCATCCAGCTCTACGTCAACAGAGCGCTTGAGAACGTTGAAGAGAA
TGCCAACTCTGGAGTGATTTCTCGCCAGTTTTTTCATAGACTGGGACAAGTAC
AACAAGCGCTACTCCACCTGGGCTGGGGTCTCTCAGCTTGTCTACTATCCTG
AGAACTACATAGATCCGACGATGCGGATTGGCCAGACCAAGATGATGGATG
CCCTCCTTCAGTCGGTGTCCCAGAGCCAGCTCAATGCTGACACTGTGGAGGA

TGCCTTCATGAGCTACCTCACCTCCTTCGAGCAAGTTGCCAACCTCAAGGTC
ATCTCTGCTTACCACGACAACATCAACAATGACCAAGGGCTCACCTACTTCA
TTGGCCTGTCTGAAACTGATGCGGGTGAGTATTACTGGCGCTCAGTGGACCA
CAGCAAGTTCAACGATGGCAAGTTTGCTGCAAATGCCTGGTCTGAGTGGCA
CAAGATTGACTGCCCCATCAACCCGTACAAGTCCACCATCAGACCTGTCATC
TACAAGAGCCGCTTGTACTTGCTCTGGCTTGAGCAGAAGGAAATCACGAAG
CAGACTGGCAACTCCAAAGATGGCTACCAGACTGAGACGGACTACCGCTAT
GAGTTGAAACTTGCTCACATCCGCTATGATGGTACATGGAACACTCCGATA
ACGTTTGATGTGAACAAGAAGATTTCCGAGCTGAAACTGGAGAAGAACAGA
GCGCCTGGGCTCTACTGTGCTGGCTACCAAGGGGAAGATACGCTGTTGGTG
ATGTTCTACAACCAGCAAGACACCCTTGACTCGTACAAGAACGCTTCCATGC
AAGGCCTCTACATCTTTGCTGACATGGCTTCCAAAGACATGACTCCGGAGCA
GAGCAATGTCTACCGGGACAACCTCCTACCAGCAATTTGACACCAACAATGT
TCGGAGGGTCAATAACCGCTATGCGGAAGATTATGAGATCCCAAGCTCAGT
GTCTAGCCGCAAGGACTATGGCTGGGGAGACTACTATCTCAGCATGGTGTA
CAATGGTGACATACCCACGATCAACTACAAGGCTGCCTCCTCAGACCTGAA
GATATACATCAGCCCCAAGCTCCGCATCATTACAATGGCTATGAGGGCCA
GAAGAGGAACCAGTGCAACTTGATGAACAAGTATGGCAAACCTTGGGGACA
AGTTCATTGTCTACACCTCGCTTGGTGTGAACCCGAACAATTCCTCGAACAA
GCTCATGTTCTACCCGGTCTACCAGTACAGCGGCAACACCTCTGGCTTGAAC
CAAGGGAGGCTCCTGTTCCACAGAGACACCACGTACCCGAGCAAGGTGGAG
GCGTGGAATTCCTGGTGCCAAAAGGTCACCTACCAACCAGAATGCAGCCATT
GGTGATGACTATGCCACAGACAGCCTGAACAAGCCTGATGACCTGAAGCAG
TACATCTTCATGACTGACTCCAAGGGCACAGCCACTGATGTGTCTGGTCCGG
TGGAGATCAAACTGCAATCAGCCCAGCCAAGGTCCAAATCATTGTCAAAG
CTGGTGGCAAGGAACAGACCTTCACAGCTGACAAAGATGTGAGCATCCAGC
CAAGCCCCTCCTTTGATGAGATGAACTACCAGTTCAACGCTCTTGAAATTGA
TGGCTCGGGACTCAACTTCATCAACAATTCGGCTTCAATTGATGTGACGTTT
ACTGCCTTTGCGGAGGATGGGAGGAAATTGGGCTATGAGAGCTTCTCAATA

CCAGTCACCTTGAAGGTTTCCACTGACAATGCACTCACGCTTCATCACAACG
AGAATGGAGCGCAGTACATGCAATGGCAGAGCTACCGCACAAGGTTGAAC
ACCCTCTTTGCAAGGCAACTTGTGGCCAGAGCCACGACTGGCATTGACACC
ATACTCAGCATGGAAACGCAGAACATCCAAGAGCCACAGTTGGGCAAGGGT
TTCTATGCCACCTTTGTGATCCCACCCTACAACCTGTCAACGCATGGTGATG
AGCGCTGGTTCAAGCTGTACATCAAGCACGTGGTTGACAACAATTCCCACA
TCATATACTCGGGTCAGCTCACTGACACGAACATCAACATCACCTGTTCAT
CCCCTTGATGACGTTCCCCTGAACCAAGACTACCATGCCAAGGTCTACATG
ACCTTCAAGAAATCACCGTCAGATGGCACCTGGTGGGGACCGCACTTCGTT
CGGGATGACAAAGGCATTGTCACAATCAACCCCAAGTCCATACTCACCCAC
TTTGAGTCTGTGAATGTTCTGAATAACATCTCCTCAGAGCCGATGGACTTCT
CGGGTGCCAACTCCCTGTACTTCTGGGAGTTGTTCTATTACACGCCGATGCT
TGTGGCGCAGAGGTTGCTCCATGAACAGAACTTTGATGAGGCCAACCGCTG
GCTCAAGTATGTCTGGAGCCCCCTCGGGTTACATTGTGCATGGCCAGATCCAG
AACTACCAATGGAATGTTCGCCCATGCTTGAGGACACCTCCTGGAACTCTG
ACCCCCTTGACTCGGTGGACCCTGATGCGGTGGCTCAGCATGACCCCATGCA
CTACAAGGTCTCAACCTTCATGAGGACCCTGGACCTTCTGATTGCCAGAGGA
GACCATGCTTACCGCCAATTGGAACGGGACACACTGAATGAGGCAAAGATG
TGGTACATGCAAGCTCTGCACCTCTTGGGAGACAAGCCGTACCTCCCGCTCA
GCACCACATGGTCAGACCCAAGGTTGGACAGAGCAGCTGACATCACAACCT
AGAATGCTCATGACTCTGCCATTGTGGCTCTGAGGCAGAACATCCCAACAC
CTGCGCCACTGTGCTGAGATCTGCGAACACCCTGACAGACCTGTTCTCTCC
CCAGATCAATGAGGTCATGATGAACTACTGGCAAACCTTGGCGCAGCGGGT
CTACAACCTCCGCCACAACCTCTCCATTGATGGGCAGCCGCTGTACCTCCCA
ATCTATGCCACACCAGCTGACCCAAAGGCGCTTCTCAGCGCAGCTGTGGCC
ACGAGCCAAGGGGGAGGCAAGCTCCCTGAGAGCTTCATGTCGCTCTGGAGG
TTTCCCCACATGTTGGAGAATGCCAGAGGCATGGTGAGCCAACTGACTCAG
TTTGGCTCGACGCTCCAGAACATCATTGAGAGGCAAGATGCAGAGGCTCTG
AATGCGTTGCTCCAGAATCAAGCAGCTGAGTTGATCCTGACGAACCTGTCA

ATCCAAGACAAGACCATTGAGGAACTTGATGCGGAAAAGACAGTCCTTGAA
AAGAGCAAGGCTGGAGCCCAAAGCCGGTTCGACTCATATGGCAAGCTGTAT
GATGAGAACATCAATGCTGGGGAGAATCAAGCCATGACCCTGAGGGCTTCA
GCAGCGGGTCTGACCACGGCAGTGCAAGCGTCTCGCTTGGCTGGGGCTGCG
GCTGACCTCGTTCCCAACATCTTTGGGTTTGCTGGTGGCGGATCAAGGTGGG
GAGCCATTGCAGAAGCAACGGGCTATGTGATGGAGTTCTCTGCCAATGTCA
TGAACACTGAGGCAGACAAAATCAGCCAATCGGAGACCTACAGACGGAGA
CGGCAAGAATGGGAGATACAAAGGAACAATGCAGAGGCAGAACTGAAGCA
AATAGATGCCCAACTGAAGTCCTTGGCTGTCAGAAGGGAGGCTGCGGTCCT
CCAAAAGACCTCCCTCAAGACCCAGCAAGAGCAAACCCAGTCCCAGTTGGC
GTTCTCCAGAGGAAGTTCTCGAACCAAGCGCTGTACAACTGGCTGAGGGG
AAGTTGGCAGCCATCTACTTCCAGTTCTATGACCTTGCTGTGGCCAGATGC
CTCATGGCGGAACAAGCCTACCGCTGGGAACTGAATGATGACTCTGCCAGA
TTCATCAAACCGGGTGCATGGCAAGGCACATATGCTGGACTCCTTGCTGGG
GAGACACTCATGCTCTCATTGGCCCAGATGGAGGATGCTCACCTCAAACGG
GACAAGAGGGCTCTGGAAGTGGAGCGGACAGTCAGCCTTGCGGAGGTCTAT
GCGGGACTGCCCAAAGACAATGGACCATTTTCGTTGGCGCAAGAGATAGAC
AAGTTGGTCAGCCAAGGGTCTGGATCAGCGGGTTCTGGAAACAACAATCTG
GCGTTCGGTGCTGGCACTGACACCAAGACGTCCCTCCAAGCCTCAGTCTCCT
TTGCTGACCTGAAGATAAGGGAGGACTACCCAGCGTCCCTTGGGAAGATCA
GACGCATCAAGCAGATTTTCAGTGACCCTGCCAGCTCTTCTGGGTCCATACCA
AGATGTTCAAGCGATCCTCTCCTATGGGGACAAGGCTGGTTTGGCGAATGG
CTGTGAGGCCCTTGCTGTGTACATGGCATGAATGACTCTGGGCAGTTCCAG
CTTGATTTCAACGATGGCAAGTTCCTGCCATTCGAGGGCATAGCCATTGATC
AAGGCACCCTGACCCTCTCCTTCCCAATGCTTCGATGCCAGAGAAGGGAA
AACAAGCCACCATGCTCAAGACCCTGAATGATATCATACTCCACATCCGCT
ACACCATCAAGTGAGTAGTTAGCTTAATCACCTAGAGCTCGTTTAAACTGAG
GGCACTGAAGTCGCTTGATGTGCTGAATTGTTTGTGATGTTGGTGGCGTATT
TTGTTTAAATAAGTAAGCATGGCTGTGATTTTATCATATGATCGATCTTTGG

GGTTTTATTTAACACATTGTAAAATGTGTATCTATTAATAACTCAATGTATA
 AGATGTGTTTCATTCTTCGGTTGCCATAGATCTGCTTATTTGACCTGTGATGTT
 TTGACTCCAAAAACCAAATCACAACCTCAATAAACTCATGGAATATGTCCA
 CCTGTTTCTTGAAGAGTTCATCTACCATTCCAGTTGGCATTATCAGTGTTGC
 AGCGGCGCTGTGCTTTGTAACATAACAATTGTTACGGCATATATCCAA (SEC.
 ID NRO.:6)

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGT
 CTAAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTGTACACTTGTTTGAAGTGC
 AGTTTATCTATCTTTATACATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAAT
 CTATAGTACTACAATAATATCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGT
 TAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGACTCTACAGT
 TTTATCTTTTTAGTGTCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCT
 ATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAAT
 GGTTTTTATAGACTAATTTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCT
 AAATTAAGAAAACATAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATA
 TAAAATAGAATAAAATAAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGA
 AATTAAAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGC
 CTGTTAAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAG
 CGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCAGGCATCTCTGTCGCTGCCT
 CTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGG
 CATCCAGAAATTGCGTGCGGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGC
 GGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCTTTCCAC
 CGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTCC
 ACACCCTCTTTCCCAACCTCGTGTTGTTTCGGAGCGCACACACACAACCA
 GATCTCCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGGGTACCCTGAAG
 GCTCGACAAGGCAGTCCACGGAGGAGCTGATATTTGGTGGACAAGCTGTGG
 ATAGGAGCAACCCTATCCCTAATATAACCAGCACCACCAAGTCAGGGCAATC
 CCCAGATCACCCCAGCAGATTCGAAGAAGGTACAGTACACACACATGTATA

TATGTATGATGTATCCCTTCGATCGAAGGCATGCCTTGGTATAATCACTGAG
 TAGTCATTTTATTACTTTGTTTTGACAAGTCAGTAGTTCATCCATTTGTCCCA
 TTTTTCAGCTTGGAAGTTTGGTTGCACTGGCACTTGGTCTAATAACTGAGT
 AGTCATTTTATTACGTTGTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCAT
 TTTTTCAGCTAGGAAGTTTGGTTGCACTGGCCTTGGACTAATAACTGATTAG
 TCATTTTATTACATTGTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCATTT
 TTCAGCTAGGAAGTTCGGATCTGGGGCCATTTGTTCCAGGCACGGGATAAG
 CATTCAGCC (SEC. ID NRO.:7)

El constructo pDAS5143 (por ejemplo, pDAB3924) se construyó de modo que contuviera dos casetes de expresión génica. El primer casete de expresión génica (SEC. ID NRO.:8) contenía el promotor corriente arriba del virus baciliforme de caña de azúcar (Patente de EE.UU. Nro. 6.489.462), seguido por el intrón 6 de alcohol deshidrogenasa (I) de *Zea mays* (Dennis *et al.*, (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:3983–4000) y 5'–UTR del virus de la veta del maíz (Mullineaux *et al.*, (1984) *EMBO J.* 3:3063–3068) unido operativamente al transgen *tcdA* (Solicitud de Patente de EE.UU. Nro. 2009/0221501) y flanqueado por la 3'–UTR de peroxidasa 5 de *Zea mays* (Solicitud de Patente Internacional Nro. 1998/056921). El segundo casete de expresión génica contenía un gen de marcador seleccionable y consistía en el promotor de actina de *Oryza sativa* (Patente de EE.UU. Nro. 6.429.357) unido operativamente a un transgen de *fosfinotricina acetil transferasa* (Wohlleben *et al.*, (1988) *Gene* 70: 25–37) y terminado por la 3'–UTR de lipasa de *Zea mays* (Patente de EE.UU. Nro. 7.179.902). Este constructo fue inmovilizado en el vector binario pSB1 Superbinario (Japan Tobacco, Tokio, JP). Los constructos usados para completar pDAS5143 fueron confirmados molecularmente por digestión de enzimas de restricción y secuenciación de ADN. El nuevo promotor del virus baciliforme de caña de azúcar, seguido por el intrón 6 de alcohol deshidrogenasa (I) de *Zea mays* y 5'–UTR del virus de la veta del maíz, se divulga en la presente como SEC. ID NRO.:9.

ATCGGAAGTTGAAGACAAAGAAGGTCTTAAATCCTGGCTAGCAACACTGAA
CTATGCCAGAAACCACATCAAAGATATCGGCAAGCTTCTTGGCCCATTATAT
CCAAAGACCTCAGAGAAAGGTGAGCGAAGGCTCAATTCAGAAGATTGGAA
GCTGATCAATAGGATCAAGACAATGGTGAGAACGCTTCCAAATCTCACTAT
TCCACCAGAAGATGCATACATTATCATTGAAACAGATGCATGTGCAACTGG
ATGGGGAGCAGTATGCAAGTGGAAGAAAAACAAGGCAGACCCAAGAAATA
CAGAGCAAATCTGTAGGTATGCCAGTGGAATAATTTGATAAGCCAAAAGGAA
CCTGTGATGCAGAAATCTATGGGGTTATGAATGGCTTAGAAAAGATGAGAT
TGTTCTACTTGGACAAAAGAGAGATCACAGTCAGAACTGACAGTAGTGCAA
TCGAAAGGTTCTACAACAAGAGTGCTGAACACAAGCCTTCTGAGATCAGAT
GGATCAGGTTTCATGGACTACATCACTGGTGCAGGACCAGAGATAGTCATTG
AACACATAAAAGGGAAGAGCAATGGTTTAGCTGACATCTTGTCCAGGCTCA
AAGCCAAATTAGCTCAGAATGAACCAACGGAAGAGATGATCCTGCTTACAC
AAGCCATAAGGGAAGTAATTCCTTATCCAGATCATCCATACACTGAGCAAC
TCAGAGAATGGGGAAACAAAATTCTGGATCCATTCCCCACATTCAAGAAGG
ACATGTTTCGAAAGAACAGAGCAAGCTTTTATGCTAACAGAGGAACCAGTTC
TACTCTGTGCATGCAGGAAGCCTGCAATTCAGTTAGTGTCCAGAACATCTGC
CAACCCAGGAAGGAAATTCTTCAAGTGCGCAATGAACAAATGCCATTGCTG
GTACTGGGCAGATCTCATTGAAGAACACATTCAAGACAGAATTGATGAATT
TCTCAAGAATCTTGAAGTTCTGAAGACCGGTGGCGTGCAAACAATGGAGGA
GGAAGTTATGAAGGAAGTCACCAAGCTGAAGATAGAAGAGCAGGAGTTCG
AGGAATACCAGGCCACACCAAGGGCTATGTCGCCAGTAGCCGCAGAAGATG
TGCTAGATCTCCAAGACGTAAGCAATGACGATTGAGGAGGCATTGACGTCA
GGGATGACCGCAGCGGAGAGTACTGGGCCCATTCAAGTGATGCTCCACTGA
GTTGTATTATTGTGTGCTTTTCGGACAAGTGTGCTGTCCACTTTCTTTTGGCA
CCTGTGCCACTTTATTCCTTGTCTGCCACGATGCCTTTGCTTAGCTTGTAAGC
AAGGATCGCAGTGCGTGTGTGACACCACCCCCCTCCGACGCTCTGCCTATA
TAAGGCACCGTCTGTAAGCTCTTACGATCATCGGTAGTTCACCAAGGTACCC
GGGGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCTGAAGGCTCGACAAGGCAGT

CCACGGAGGAGCTGATATTTGGTGGACAAGCTGTGGATAGGAGCAACCCTA
TCCCTAATATACCAGCACCAAGTCAGGGCAATCCCCAGATCACCCCAG
CAGATTCTGAAGAAGGTACAGTACACACACATGTATATATGTATGATGTATC
CCTTCGATCGAAGGCATGCCTTGGTATAATCACTGAGTAGTCATTTTATTAC
TTTGTTTTGACAAGTCAGTAGTTCATCCATTTGTCCCATTTTTTCAGCTTGGA
AGTTTGGTTGCACTGGCACTTGGTCTAATAACTGAGTAGTCATTTTATTACG
TTGTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCATTTTTTCAGCTAGGA
AGTTTGGTTGCACTGGCCTTGGACTAATAACTGATTAGTCATTTTATTACATT
GTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCATTTTTTCAGCTAGGAAGT
TCGGATCTGGGGCCATTTGTTCCAGGCACGGGATAAGCATTTCAGCCATGGCT
AATGAGTCAGTCAAGGAGATCCCGGATGTTCTCAAATCCCAGTGTGGTTTCA
ACTGCCTCACGGACATCTCCCACAGCTCATTCAATGAGTTCCGCCAGCAAGT
CTCTGAGCACCTCTCATGGTTCGGAGACGCATGACCTCTACCACGATGCTCAG
CAAGCCCAGAAAGACAACCGGCTGTATGAGGCACGGATCCTCAAGAGGGC
CAACCCGCAGCTCCAGAATGCGGTCCACCTCGCCATCCTTGCTCCAAATGCG
GAATTGATTGGCTACAATAACCAATTCTCGGGAAGGGCCTCACAGTATGTT
GCGCCTGGCACAGTTTCGTCCATGTTTCAGCCCAGCAGCGTACCTCACAGAGC
TGTACAGAGAGGCGAGGAACCTTCATGCGTCTGACTCCGTGTACTATCTGG
ACACACGCAGACCGGACCTGAAGTCAATGGCCCTCAGCCAGCAAAACATGG
ACATTGAACTGTCCACCCTTTCTTGAGCAATGAGCTTCTGTTGGAATCCAT
CAAGACTGAGAGCAAGCTGGAAAACCTACACAAAGGTGATGGAGATGCTGT
CCACCTTCAGACCATCTGGAGCGACTCCATACCACGATGCCTATGAGAATGT
GAGGGAGGTCATTCAGCTTCAAGACCCTGGCCTTGAGCAGCTCAATGCCAG
CCCAGCCATTGCGGGACTGATGCACCAAGCCTCCCTGCTTGGGATCAATGCC
TCCATCAGCCCTGAGCTGTTCAACATCTTGACTGAAGAGATCACTGAGGGC
AATGCGGAGGAACTGTACAAGAAAACTTCGGCAACATTGAGCCTGCCAGC
CTTGCAATGCCGGAATACCTGAAACGCTATTACAACCTTGTCGGATGAGGAA
CTTTCGCAGTTCATTGGCAAAGCCTCAAACCTTTGGGCAGCAAGAGTACAGC
AACAATCAGCTCATCACACCTGTTGTGAACTCATCTGATGGCACTGTGAAGG

TTTACCGCATCACAAGGGAGTACACCACAAATGCCTACCAGATGGATGTTG
AACTGTTCCCGTTTGGAGGTGAAAACCTACCGGCTTGACTACAAGTTCAAGA
ACTTCTACAATGCATCCTACCTGTTCGATCAAGCTGAACGACAAACGGGAGC
TTGTGAGGACGGAAGGTGCTCCCCAAGTGAACATTGAATACTCTGCCAACA
TCACACTCAACACAGCGGACATCAGCCAGCCGTTTGAAATTGGCTTGACCA
GAGTGCTTCCCTCGGGCTCCTGGGCCTATGCGGCAGCCAAGTTTACGGTTGA
GGAGTACAACCAGTACAGCTTCCTCCTGAAGCTCAACAAGGCAATCCGGCT
GAGCAGAGCCACTGAGCTGTCACCCACCATCCTGGAGGGCATTGTGAGGTC
TGTC AACCTTCAGCTTGACATCAACACTGATGTGCTTGGCAAGGTGTTCTG
ACCAAGTATTACATGCAGCGCTATGCCATCCATGCGGAGACGGCACTGATC
CTCTGCAATGCACCCATATCGCAGCGCTCGTATGACAACCAGCCCAGCCAG
TTCGACAGACTCTTCAACACTCCCCTTCTGAACGGCCAGTACTTCAGCACTG
GAGATGAAGAGATTGACCTGAACTCTGGCTCGACGGGTGACTGGAGGAAAA
CCATCTTGAAGAGGGCCTTCAACATTGATGACGTTTCCCTCTTCCGCCTTTTG
AAGATCACAGATCACGACAACAAGGATGGCAAGATCAAGAACAATCTCAA
GAACCTTTCCAACCTCTACATTGGCAAACCTGCTTGCAGACATCCACCAGCTG
ACCATTGATGAGTTGGACCTGTTGCTGATTGCAGTTGGTGAGGGCAAGACC
AACCTCTCTGCAATCTCAGACAAACAGTTGGCAACCCTCATCCGCAAGCTG
AACACGATCACAAGCTGGCTTCACACGCAGAAGTGGTCTGTTTTCCAACGT
TCATCATGACCAGCACGTCCTACAACAAGACCCTGACTCCGGAGATCAAGA
ACCTTTTGGATACAGTCTATCATGGTCTCCAAGGCTTTGACAAGGACAAGGC
GGACCTGCTTCATGTCATGGCACCCCTACATTGCAGCCACACTCCAGCTCTCC
TCTGAAAATGTTGCCCACTCAGTGCTGTTGTGGGCTGACAAGCTCCAGCCTG
GGGATGGAGCCATGACTGCTGAGAAGTTCTGGGACTGGCTCAACACGAAGT
ACACACCTGGCTCCTCTGAGGCAGTTGAGACTCAAGAACACATTGTGCAGT
ACTGCCAAGCGCTTGCACAGTTGGAGATGGTTTACCACTCAACTGGCATCA
ACGAGAATGCCTTCCGCCTCTTTGTCACAAAGCCTGAGATGTTTGGTGCTGC
CACTGGAGCCGCTCCTGCCCATGATGCCCTGTCACTCATCATGTTGACGAGG
TTTGCAGACTGGGTCAACGCCCTTGGTGAGAAAGCCTCGTCTGTCCTGGCAG

CCTTTGAAGCCAACTCCCTGACTGCGGAACAGCTTGCGGATGCCATGAACCT
TGATGCCAACTTGCTCCTGCAAGCTTCGATCCAAGCCCAGAACCATCAGCAT
TTGCCACCTGTCACGCCTGAAAATGCGTTCTCATGCTGGACCTCCATCAACA
CCATACTCCAGTGGGTGAACGTGGCGCAACAGCTCAATGTGGCACCTCAAG
GAGTGTCAGCGCTGGTTGGGCTTGACTACATCCAGTCCATGAAGGAGACAC
CGACCTACGCGCAGTGGGAGAATGCAGCTGGCGTCTTGACAGCTGGTCTGA
ACTCACAGCAAGCCAAACACGCTGCATGCGTTCTTGATGAGAGCCGCTCTG
CTGCCCTCAGCACGTACTATATCCGGCAAGTTGCCAAGGCAGCGGCTGCCA
TCAAGTCTCGGGATGACCTCTACCAGTACTTGCTCATTGACAATCAGGTTTC
TGCTGCCATCAAAACGACCCGGATTGCTGAGGCCATAGCCAGCATCCAGCT
CTACGTCAACAGAGCGCTTGAGAACGTTGAAGAGAATGCCAACTCTGGAGT
GATTTCTCGCCAGTTTTTCATAGACTGGGACAAGTACAACAAGCGCTACTCC
ACCTGGGCTGGGGTCTCTCAGCTTGTCTACTATCCTGAGAACTACATAGATC
CGACGATGCGGATTGGCCAGACCAAGATGATGGATGCCCTCCTTCAGTCGG
TGTCCTCAGAGCCAGCTCAATGCTGACACTGTGGAGGATGCCTTCATGAGCT
ACCTCACCTCCTTCGAGCAAGTTGCCAACCTCAAGGTCATCTCTGCTTACCA
CGACAACATCAACAATGACCAAGGGCTCACCTACTTCATTGGCCTGTCTGA
AACTGATGCGGGTGAGTATTACTGGCGCTCAGTGGACCACAGCAAGTTCAA
CGATGGCAAGTTTGCTGCAAATGCCTGGTCTGAGTGGCACAAGATTGACTG
CCCCATCAACCCGTACAAGTCCACCATCAGACCTGTCATCTACAAGAGCCG
CTTGTA CTGCTCTGGCTTGAGCAGAAGGAAATCACGAAGCAGACTGGCAA
CTCCAAAGATGGCTACCAGACTGAGACGGACTACCGCTATGAGTTGAAACT
TGCTCACATCCGCTATGATGGTACATGGAACACTCCGATAACGTTTGATGTG
AACAAGAAGATTTTCGGAGCTGAAACTGGAGAAGAACAGAGCGCCTGGGCT
CTACTGTGCTGGCTACCAAGGGGAAGATACGCTGTTGGTGATGTTCTACAAC
CAGCAAGACACCCTTGACTCGTACAAGAACGCTTCCATGCAAGGCCTCTAC
ATCTTTGCTGACATGGCTTCCAAAGACATGACTCCGGAGCAGAGCAATGTCT
ACCGGGACAACCTCCTACCAGCAATTTGACACCAACAATGTTTCGGAGGGTCA
ATAACCGCTATGCGGAAGATTATGAGATCCCAAGCTCAGTGTCTAGCCGCA

AGGACTATGGCTGGGGAGACTACTATCTCAGCATGGTGTACAATGGTGACA
TACCCACGATCAACTACAAGGCTGCCTCCTCAGACCTGAAGATATACATCA
GCCCCAAGCTCCGCATCATTCAATGGCTATGAGGGCCAGAAGAGGAACC
AGTGCAACTTGATGAACAAGTATGGCAAACCTTGGGGACAAGTTCATTGTCT
ACACCTCGCTTGGTGTGAACCCGAACAATTCCTCGAACAAGCTCATGTTCTA
CCCGGTCTACCAGTACAGCGGCAACACCTCTGGCTTGAACCAAGGGAGGCT
CCTGTTCCACAGAGACACCACGTACCCGAGCAAGGTGGAGGCGTGGATTCC
TGGTGCCAAAAGGTCACTCACCAACCAGAATGCAGCCATTGGTGATGACTA
TGCCACAGACAGCCTGAACAAGCCTGATGACCTGAAGCAGTACATCTTCAT
GACTGACTCCAAGGGCACAGCCACTGATGTGTCTGGTCCGGTGGAGATCAA
CACTGCAATCAGCCCAGCCAAGGTCCAAATCATTGTCAAAGCTGGTGGCAA
GGAACAGACCTTCACAGCTGACAAAGATGTGAGCATCCAGCCAAGCCCCTC
CTTTGATGAGATGAACTACCAGTTCAACGCTCTTGAAATTGATGGCTCGGGA
CTCAACTTCATCAACAATTCGGCTTCAATTGATGTGACGTTCACTGCCTTTG
CGGAGGATGGGAGGAAATTGGGCTATGAGAGCTTCTCAATACCAGTCACCT
TGAAGGTTTCCACTGACAATGCACTCACGCTTCATCACAACGAGAATGGAG
CGCAGTACATGCAATGGCAGAGCTACCGCACAAGGTTGAACACCCTCTTTG
CAAGGCCAACTTGTGGCCAGAGCCACGACTGGCATTGACACCATACTCAGCA
TGGAACCGCAGAACATCCAAGAGCCACAGTTGGGCAAGGGTTTCTATGCCA
CCTTTGTGATCCCACCCTACAACCTGTCAACGCATGGTGATGAGCGCTGGTT
CAAGCTGTACATCAAGCACGTGGTTGACAACAATTCCCACATCATATACTCG
GGTCAGCTCACTGACACGAACATCAACATCACCTGTTTCATCCCCTTGATG
ACGTTCCCCTGAACCAAGACTACCATGCCAAGGTCTACATGACCTTCAAGA
AATCACCGTCAGATGGCACCTGGTGGGGACCGCACTTCGTTCTGGGATGACA
AAGGCATTGTCACAATCAACCCCAAGTCCATACTCACCCACTTTGAGTCTGT
GAATGTTCTGAATAACATCTCCTCAGAGCCGATGGACTTCTCGGGTGCCAAC
TCCCTGTACTTCTGGGAGTTGTTCTATTACACGCCGATGCTTGTGGCGCAGA
GGTTGCTCCATGAACAGAACTTTGATGAGGCCAACCGCTGGCTCAAGTATG
TCTGGAGCCCCTCGGGTTACATTGTGCATGGCCAGATCCAGAACTACCAATG

GAATGTTGCCCCATTGCTTGAGGACACCTCCTGGAACCTTGACCCCCCTTGAC
TCGGTGGACCCTGATGCGGTGGCTCAGCATGACCCCATGCACTACAAGGTC
TCAACCTTCATGAGGACCCTGGACCTTCTGATTGCCAGAGGAGACCATGCTT
ACCGCCAATTGGAACGGGACACACTGAATGAGGCAAAGATGTGGTACATGC
AAGCTCTGCACCTCTTGGGAGACAAGCCGTACCTCCCGCTCAGCACCAT
GGTCAGACCCAAGGTTGGACAGAGCAGCTGACATCACAACCTCAGAATGCTC
ATGACTCTGCCATTGTGGCTCTGAGGCAGAACATCCCAACACCTGCGCCACT
GTCGCTGAGATCTGCGAACACCCTGACAGACCTGTTCTCCCCCAGATCAAT
GAGGTCATGATGAACTACTGGCAAACCTTGGCGCAGCGGGTCTACAACCTC
CGCCACAACCTCTCCATTGATGGGCAGCCGCTGTACCTCCCAATCTATGCCA
CACCAGCTGACCCAAAGGCGCTTCTCAGCGCAGCTGTGGCCACGAGCCAAG
GGGGAGGCAAGCTCCCTGAGAGCTTCATGTCGCTCTGGAGGTTTCCCCACAT
GTTGGAGAATGCCAGAGGCATGGTGAGCCAACCTGACTCAGTTTGGCTCGAC
GCTCCAGAACATCATTGAGAGGCAAGATGCAGAGGCTCTGAATGCGTTGCT
CCAGAATCAAGCAGCTGAGTTGATCCTGACGAACCTGTCAATCCAAGACAA
GACCATTGAGGAACTTGATGCGGAAAAGACAGTCCTTGAAAAGAGCAAGG
CTGGAGCCCAAAGCCGGTTCGACTCATATGGCAAGCTGTATGATGAGAACA
TCAATGCTGGGGAGAATCAAGCCATGACCCTGAGGGCTTCAGCAGCGGGTC
TGACCACGGCAGTGCAAGCGTCTCGCTTGGCTGGGGCTGCGGCTGACCTCG
TTCCCAACATCTTTGGGTTTGCTGGTGGCGGATCAAGGTGGGGAGCCATTGC
AGAAGCAACGGGCTATGTGATGGAGTTCTCTGCCAATGTCATGAACACTGA
GGCAGACAAAATCAGCCAATCGGAGACCTACAGACGGAGACGGCAAGAAT
GGGAGATACAAAGGAACAATGCAGAGGCAGAACTGAAGCAAATAGATGCC
CAACTGAAGTCCTTGGCTGTCAGAAGGGAGGCTGCGGTCCTCCAAAAGACC
TCCCTCAAGACCCAGCAAGAGCAAACCCAGTCCCAGTTGGCGTTCCTCCAG
AGGAAGTTCTCGAACCAAGCGCTGTACAACTGGCTGAGGGGAAGGTTGGCA
GCCATCTACTTCCAGTTCTATGACCTTGCTGTGGCCAGATGCCTCATGGCGG
AACAAGCCTACCGCTGGGAACTGAATGATGACTCTGCCAGATTCATCAAAC
CGGGTGATGGCAAGGCACATATGCTGGACTCCTTGCTGGGGAGACACTCA

TGCTCTCATTGGCCCAGATGGAGGATGCTCACCTCAAACGGGACAAGAGGG
 CTCTGGAAGTGGAGCGGACAGTCAGCCTTGCGGAGGTCTATGCGGGACTGC
 CCAAAGACAATGGACCATTTTCGTTGGCGCAAGAGATAGACAAGTTGGTCA
 GCCAAGGGTCTGGATCAGCGGGTCTTGGAACAACAATCTGGCGTTCGGTG
 CTGGCACTGACACCAAGACGTCCCTCCAAGCCTCAGTCTCCTTTGCTGACCT
 GAAGATAAGGGAGGACTACCCAGCGTCCCTTGGAAGATCAGACGCATCAA
 GCAGATTTCAGTGACCCTGCCAGCTCTTCTGGGTCCATACCAAGATGTTCAA
 GCGATCCTCTCCTATGGGGACAAGGCTGGTTTGGCGAATGGCTGTGAGGCC
 CTTGCTGTGTCACATGGCATGAATGACTCTGGGCAGTTCCAGCTTGATTTC
 ACGATGGCAAGTTCCTGCCATTCGAGGGCATAGCCATTGATCAAGGCACCC
 TGACCCTCTCCTTCCCCAATGCTTCGATGCCAGAGAAGGGAAAACAAGCCA
 CCATGCTCAAGACCCTGAATGATATCATACTCCACATCCGCTACACCATCAA
 GTGAGTAGTTAGCTTAATCACCTAGAGCTCGTTTAAACTGAGGGCACTGAA
 GTCGCTTGATGTGCTGAATTGTTTGTGATGTTGGTGGCGTATTTTGTTTAAAT
 AAGTAAGCATGGCTGTGATTTTATCATATGATCGATCTTTGGGGTTTTATTT
 AACACATTGTAAAATGTGTATCTATTAATAACTCAATGTATAAGATGTGTTC
 ATTCTTCGGTTGCCATAGATCTGCTTATTTGACCTGTGATGTTTTGACTCCAA
 AAACCAAAATCACAACCTCAATAAACTCATGGAATATGTCCACCTGTTTCTTG
 AAGAGTTCATCTACCATTCAGTTGGCATTATCAGTGTTGCAGCGGCGCTG
 TGCTTTGTAACATAACAATTGTTACGGCATATATCCAA (SEC. ID NRO.:8)

ATCGGAAGTTGAAGACAAAGAAGGTCTTAAATCCTGGCTAGCAACACTGAA
 CTATGCCAGAAACCACATCAAAGATATCGGCAAGCTTCTTGCCCCATTATAT
 CCAAAGACCTCAGAGAAAGGTGAGCGAAGGCTCAATTCAGAAGATTGGAA
 GCTGATCAATAGGATCAAGACAATGGTGAGAACGCTTCCAAATCTCACTAT
 TCCACCAGAAGATGCATACATTATCATTGAAACAGATGCATGTGCAACTGG
 ATGGGGAGCAGTATGCAAGTGGAAGAAAAACAAGGCAGACCCAAGAAATA
 CAGAGCAAATCTGTAGGTATGCCAGTGGAATAATTTGATAAGCCAAAAGGAA
 CCTGTGATGCAGAAATCTATGGGGTTATGAATGGCTTAGAAAAGATGAGAT

TGTTCTACTTGGACAAAAGAGAGATCACAGTCAGAACTGACAGTAGTGCAA
TCGAAAGGTTCTACAACAAGAGTGCTGAACACAAGCCTTCTGAGATCAGAT
GGATCAGGTTTCATGGACTACATCACTGGTGCAGGACCAGAGATAGTCATTG
AACACATAAAAAGGGAAGAGCAATGGTTTTAGCTGACATCTTGTCCAGGCTCA
AAGCCAAATTAGCTCAGAATGAACCAACGGAAGAGATGATCCTGCTTACAC
AAGCCATAAGGGAAGTAATTCCTTATCCAGATCATCCATACACTGAGCAAC
TCAGAGAATGGGGAAACAAAATTCTGGATCCATTCCCCACATTCAAGAAGG
ACATGTTTCGAAAGAACAGAGCAAGCTTTTATGCTAACAGAGGAACCAGTTC
TACTCTGTGCATGCAGGAAGCCTGCAATTCAGTTAGTGTCCAGAACATCTGC
CAACCCAGGAAGGAAATTCTTCAAGTGCGCAATGAACAAATGCCATTGCTG
GTACTGGGCAGATCTCATTGAAGAACACATTCAAGACAGAATTGATGAATT
TCTCAAGAATCTTGAAGTTCTGAAGACCGGTGGCGTGCAAACAATGGAGGA
GGAAGTTATGAAGGAAGTCACCAAGCTGAAGATAGAAGAGCAGGAGTTCG
AGGAATACCAGGCCACACCAAGGGCTATGTGCCAGTAGCCGCAGAAGATG
TGCTAGATCTCCAAGACGTAAGCAATGACGATTGAGGAGGCATTGACGTCA
GGGATGACCGCAGCGGAGAGTACTGGGCCCATTTCAGTGGATGCTCCACTGA
GTTGTATTATTGTGTGCTTTTCGGACAAGTGTGCTGTCCACTTTCTTTTGGCA
CCTGTGCCACTTTATTCCTTGTCTGCCACGATGCCTTTGCTTAGCTTGTAAGC
AAGGATCGCAGTGCGTGTGTGACACCACCCCCCTTCCGACGCTCTGCCTATA
TAAGGCACCGTCTGTAAAGCTCTTACGATCATCGGTAGTTCACCAAGGTACCC
GGGGTCGACCTCGAGGGGGGGGGCCCGGTACCCTGAAGGCTCGACAAGGCAGT
CCACGGAGGAGCTGATATTTGGTGGACAAGCTGTGGATAGGAGCAACCCTA
TCCCTAATATAACCAGCACCAAGTCAGGGCAATCCCCAGATCACCCCAG
CAGATTCTGAAGAAGGTACAGTACACACACATGTATATATGTATGATGTATC
CCTTCGATCGAAGGCATGCCTTGGTATAATCACTGAGTAGTCATTTTATTAC
TTTGTTTTGACAAGTCAGTAGTTCATCCATTTGTCCCATTTTTTTCAGCTTGGA
AGTTTGGTTGCACTGGCACTTGGTCTAATAACTGAGTAGTCATTTTATTACG
TTGTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCATTTTTTTCAGCTAGGA
AGTTTGGTTGCACTGGCCTTGGACTAATAACTGATTAGTCATTTTATTACATT

GTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCATTTCAGCTAGGAAGT
TCGGATCTGGGGCCATTGTTCAGGCACGGGATAAGCATTTCAGCC (SEC. ID
NRO.:9)

El constructo pDAB1405, un constructo de control, se construyó de modo que contuviera dos casetes de expresión génica, ambos flanqueados por las Regiones de Unión de Matriz RB7 (MAR; Solicitud de Patente Internacional Nro. WO9727207). El primer casete de expresión génica contenía el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays* unido operativamente al transgen de *proteína fluorescente verde* (Patente de EE.UU. Nro. 6.172.188) y flanqueado por la 3'-UTR de peroxidasa 5 de *Zea mays*. El segundo casete de expresión génica contenía un gen de marcador seleccionable y consistía en el promotor de actina de *Oryza sativa* (Patente de EE.UU. Nro. 6.429.357) unido operativamente a un transgen de *fosfinotricina acetil transferasa* (Wohlleben *et al.*, (1988) *Gene* 70: 25–37) y terminado por la 3'-UTR de lipasa de *Zea mays* (Patente de EE.UU. Nro. 7.179.902). Este constructo fue inmovilizado en el vector binario pSB1 Superbinario (Japan Tobacco, Tokio, JP). Los constructos usados para completar pDAB1405 fueron confirmados molecularmente por digestión de enzimas de restricción y secuenciación de ADN.

TABLA 1: Los constructos se designan por número pDAS, con una breve descripción de los elementos regulatorios y el marcador seleccionable usado en cada constructo.

Nombre del constructo	Promotor	Intrón	Líder	Gen de interés	3'-UTR	Marcador seleccionable
pDAS5128	ZmUbi1	ADH1 intrón 6	MSV	tcdA	Per 5	PAT
pDAS5143	SCBV	ADH1 intrón 6	MSV	tcdA	Per 5	PAT
pDAS5144	ZmPer 5	ADH1	MSV	tcdA	Per 5	PAT

		intrón 6				
pDAB1405	ZmUbi1	—	—	gfp	Per5	PAT

Ejemplo 3: Transformación de plantas y confirmación molecular

Material de planta. Se usó *Zea mays* c.v. Hi-II para todos los experimentos de transformación. Las plantas se cultivaron en el invernadero y las orejas se cosecharon aproximadamente 9–11 días después de la polinización, cuando los embriones zigóticos inmaduros tenían entre 1 y 2 mm de longitud. Las orejas se descascararon, se enjuagaron y se almacenaron a 4°C durante hasta 1 día antes de usar.

Inicio del cultivo de agrobacterium. La cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* que albergaba los constructos descritos antes se mantuvo en forma de solución madre de glicerol a –80°C. Antes del inicio de los experimentos de transformación, las bacterias se vertieron desde las soluciones madre de glicerol sobre placas de YEP que contenían 250 mg/l de estreptomina, 100 mg/l de espectinomicina y 10 mg/l de tetraciclina. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas y luego se transfirieron a 19°C durante 2 días, hasta que se desarrolló un piso de células en cada placa.

Cocultivo de embriones inmaduros. Se tomaron de uno a dos bucles de *Agrobacterium* de cada placa de YEP y se suspendieron en 45 ml de medio N6–inf (sales de N6 y vitaminas, 1,5 mg/l de 2,4–D, 700 mg/l de L–prolina, 6,84% de sacarosa, 3,6% de glucosa, pH ajustado a 5,2), suplementado con 100 µM de acetosiringona, y se sometieron a vórtex hasta que se obtuvo una suspensión uniforme. Las bacterias se transfirieron a matraces Nephelo™, y la densidad del cultivo se ajustó a aproximadamente 200 unidades Klett usando el filtro azul. Los matraces se agitaron a 75 rpm en un agitador giratorio durante 2–4 horas a temperatura ambiente, mientras se aislaban los embriones inmaduros. Las orejas de maíz se esterilizaron por enjuague en etanol al 70% durante 5 minutos, seguido por 20–30 minutos de inmersión en una

solución de lavandina al 20% que contenía varias gotas de Liquinox[®]. Las orejas se enjuagaron tres veces en agua desionizada estéril y se envolvieron en toallas de papel estériles y papel de aluminio hasta su uso. El protocolo de cocultivo y selección siguió estrechamente aquel descrito por Frame *et al.* (*Plant Physiol.* 129: 12–22, 2005). Los embriones zigóticos inmaduros se escindieron de las mazorcas de maíz y se colocaron en tubos Eppendorf que contenían 2 ml de medio N6–inf con 100 μ M de acetosiringona. Los embriones de múltiples orejas se combinaron en tubos o se mantuvieron separados. Los embriones se lavaron en medio de infección 1–2 veces, y la solución se reemplazó con aproximadamente 1 ml de suspensión de bacterias. El tubo se invirtió suavemente varias veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los embriones se transfirieron a medio N6–AS (KW) (sales de N6 y vitaminas, 1,5 mg/l de 2,4–D, 700 mg/l de L–prolina, 0,85 mg/l de nitrato de plata, 300 mg/l de L–cisteína, 3% de sacarosa, 3 g/l de Gelrite[™], 100 μ M de acetosiringona y pH ajustado a 5,8) en placas de 100 x 15 mm. Luego de eliminar el exceso de líquido de la placa, los embriones se orientaron con el lado escutelar hacia arriba usando un microscopio.

Las placas se sellaron con cinta 3M[®] o Parafilm[®], y se incubaron durante 3 a 4 días a 20°C en la oscuridad. Para los constructos TcdA, se trataron 50–120 embriones por constructo, y se trataron aproximadamente 30–50 embriones para el constructo de control positivo (pDAB1405). Para monitorear la eficiencia de la transformación, se evaluaron aislados de control positivo putativos en cuanto a la expresión de GFP al cabo de 2 semanas. La suspensión de *Agrobacterium* restante se centrifugó a 5000 rpm en una centrífuga de mesa, y el pellet se resuspendió en 100 μ l de líquido, y luego se vertieron en una placa YEP +estrep/espec/tet y se dejó incubar durante 3 días a 28°C, y después se usó para la revalidación. Como control positivo para evaluar la respuesta del cultivo tisular del material donante de maíz, se colocaron aproximadamente 5 embriones por oreja en medio 15Ag (sales de N6 y vitaminas, 100 mg/l de hidrolizado de caseína enzimático, 1 mg/l de 2,4D, 2% de sacarosa, 2,5 g/l de Gelrite[™], pH 5,8, suplementado con 10 mg/l de nitrato de plata y 25 mM de L–prolina) y se incubaron a 28°C en la

oscuridad durante 2 semanas. Los embriones de control se calificaron en cuanto a la respuesta embriogénica a las 2 y 4 semanas, y luego se descartaron.

Aislación, selección y regeneración. Luego de 3–4 días de cocultivo, los embriones sobrevivientes se transfirieron a medio de reposo KW (sales de N6 y vitaminas, 1,5 mg/l de 2,4–D, 700 mg/l de L–prolina, 500 mg/l de MES, 0,85 mg/l de nitrato de plata, 100 mg/l de vancomicina, 100 mg/l de cefotaxima, 3% de sacarosa, 8 g/l de TC agar y pH ajustado a 5,8). Se colocaron diez embriones en cada placa de 60 x 20 mm y se sellaron con cinta 3M® o Parafilm®. Las placas se incubaron en una sala de cultivo a oscuras a 28°C durante 7 días. Debido a que todos los constructos contenían el gen PAT como marcador seleccionable, se usó la formulación basada en bialafos Herbiace® como agente selectivo. Los embriones se transfirieron a medio KW con N6 (1,5H) (sales de N6 y vitaminas, 1,5 mg/l de 2,4–D, 700 mg/l de L–prolina, 500 mg/l de MES, 0,85 mg/l de nitrato de plata, 100 mg/l de vancomicina, 100 mg/l de cefotaxima, 1,5 mg/l de Herbiace®, 3% de sacarosa, 8 g/l de TC agar y pH ajustado a 5,8). Luego de aproximadamente dos semanas, los embriones se transfirieron a un medio con un nivel doble de Herbiace®, y posteriormente se hicieron transferencias a medio KW con N6 (3,0H) (sales de N6 y vitaminas, 1,5 mg/l de 2,4–D, 700 mg/l de L–prolina, 500 mg/l de MES, 0,85 mg/l de nitrato de plata, 100 mg/l de vancomicina, 100 mg/l de cefotaxima, 3,0 mg/l de Herbiace®, 3% de sacarosa, 8 g/l de TC agar y pH ajustado a 5,8). Luego de la primera transferencia a medio KW con N6 (3,0H), todo tejido embriogénico de rápido crecimiento se subcultivó en una placa separada de medio KW con N6 (3,0H) para acumular aislados transgénicos putativos. Cuando se obtuvo suficiente cantidad de material de callo embriogénico, se tomaron muestras para realizar ensayos de cigosidad y expresión. Los eventos que cumplían con los criterios de número de copias y expresión se transfirieron a medio de regeneración 28(1H) (sales de MS y vitaminas, 5 mg/l de BAP, 25 µg/l de 2,4–D, 3% de sacarosa, 1 mg/l de Herbiace®, 2,5 g/l de Gelrite™ y pH ajustado a 5,7) y se cultivaron durante 7 días con poca luz (13 µEm^{-2S-1}) en un fotoperíodo de 16:8 horas, seguido por 7 días de mucha luz (40 µEm^{-2S-1}). Los brotes emergentes se transfirieron a medio 36(1H) (sales de MS y vitaminas, 3% de

sacarosa, 1 mg/l de Herbiace[®], 2,5 g/l de Gelrite[™], pH 5,7) en placas de 100 x 25 mm. Cuando los brotes alcanzaron una longitud de aproximadamente 3–5 mm, se transfirieron a medio de enraizamiento SHGA (sales de SH y vitaminas, 1 g/l de mio-inositol, 1% de sacarosa, 2,5 g/l de Gelrite[™], pH 5,8) en tubos de vidrio de 25 x 150 mm. Las plántulas se transfirieron al invernadero luego de que se observara un adecuado desarrollo radicular.

Transferencia y establecimiento de plantas T0 en el invernadero. Se asignaron identificadores únicos a las plantas transgénicas, y se transfirieron al invernadero. Las plantas fueron trasplantadas de los tubos a pequeñas macetas (3,5" SVD) y cubiertas con un Humidome[™] durante una semana para ayudar a aclimatar las plantas al ambiente del invernadero (~28°C de temperatura diurna/~26°C de temperatura nocturna/16:8 iluminación suplementaria). Las plantas luego fueron trasplantadas desde las macetas pequeñas a entrenadores de raíz para realizar bioensayos de insectos (Spencer-Lemaire Industries, Edmonton, Alberta Canada; estilo Tinus 350–4). Se colocaron tres plantas por evento en entrenadores de raíz, mientras que las restantes tres plantas por evento fueron transferidas a macetas de 5 galones por el personal del invernadero para polinaciones manuales y producción de semillas T1. Aproximadamente cuatro días después del trasplante a los entrenadores de raíz, las plantas fueron infestadas para el bioensayo.

Producción de semillas T1. Las plantas que pasaron el bioensayo y las correspondientes tres plantas por evento que no fueron sometidas al bioensayo fueron trasplantadas a macetas de 5 galones. Se realizaron observaciones semanalmente para rastrear cualquier fenotipo anormal. Al emerger las orejas, se colocaron bolsas para brotes sobre los brotes antes de la emergencia del estigma, para asegurar que no hubiera contaminación cruzada por polen errante. Si algún brote hubiera producido estigma antes del recubrimiento, se tomaron notas y se removió el brote. El segundo brote se cubrió para usar para las polinizaciones. Las plantas que produjeron brotes anormales o ningún brote fueron registradas en la base de datos. Se removieron las borlas de las plantas T0 antes de la muda para eliminar el flujo de polen transgénico en el

invernadero. Se cortaron los estigmas para lograr un cepillo parejo para aceptar el polen durante las polinizaciones. El polen de la variedad endogámica *Zea mays* c.v. 5XH751 se usó para todas las polinizaciones.

Luego de completadas las polinizaciones, las plantas se colocaron en el invernadero y se dejaron crecer y desarrollar. Las orejas se pelaron 21 días después de la polinización para mejorar el secado, seguido por la cosecha completa (remoción de las orejas de la planta) 42 días después de la polinización. Las orejas se colocaron en una secadora durante 1 semana, seguido por el procesamiento de las semillas (descascarillado, conteo, envasado en sobres preimpresos e ingreso del recuento de semillas en la base de datos).

Ejemplo 4: Expresión de proteínas de plantas/eventos transgénicos

Expresión de proteínas por Western Blot en material de callos de plantas. Se analizaron muestras de callos de maíz para detectar la presencia de TcdA por Western blots. En preparación para el análisis, se recolectaron 200 mg de muestra de callos en cajas de tubos de agrupamientos de 96 cavidades (Corning, Corning, NY) y se almacenaron a -80°C . Al momento del análisis, las muestras se extrajeron agregando 4 perlas de acero (3,5 mm, Bio Spec Products, Bartlesville, OK) más 200 μl de búfer de extracción (1X solución salina abuferada con fosfato (PBS) + 0,1% Triton-X –100). Las muestras se batieron usando perlas en el molino de perlas Kleco™ (Garcia Machine, Visalia, CA) durante 3 minutos a máxima velocidad. Luego del procesamiento, las muestras se centrifugaron a 3000 rcf durante 5 minutos en una centrífuga de placas (Qiagen). El sobrenadante resultante se transfirió por pipeteado a nuevos tubos. Las muestras para Western blot se prepararon mezclando el extracto con una cantidad adecuada de búfer de muestra (búfer de muestra NuPage LDS™ 4X (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 40 mM de ditiotreitól). Se preparó un control positivo de proteína purificada (PA1, 0,4 mg/ml) en búfer de muestra como antes, hasta una concentración de 6,25 ng/ μl . Se colocó 40 microlitros de cada muestra preparada y de

estándar en tubos de PCR (Thermo Scientific) y se calentaron en un termociclador (Applied BioSystems, Foster City, CA) durante 5 minutos a 90°C. Las muestras se resolvieron en 3–8% de geles de Tris–acetato (Invitrogen EA0375) con búfer de corrida de Tris–acetato–SDS (Invitrogen).

Además, la cámara de gel interior tenía antioxidante (Invitrogen) agregado al búfer de corrida. Las muestras se cargaron según las especificaciones del gel, con 25 µl de muestra cargados para las muestras de callos, 4 µl cargados para el control de proteína purificada (25 ng) y 15 µl de un marcador de peso molecular (SeeBlue Marker™, Invitrogen, Carlsbad, CA). Los geles se corrieron a una constante de 150 V durante 75 minutos. Mientras tanto, se prepararon tacos de transferencia y membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm (Invitrogen) por inmersión en búfer de transferencia (1X NuPage Transfer Buffer™ (Invitrogen) + 10–20% metanol).

Luego de resolver las proteínas en el gel, el módulo de blot (Invitrogen) y los geles a transferir se ensamblaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los geles se transfirieron luego a una constante de 45 V durante al menos 1,5 horas (2 horas para 2 geles por módulo de blot). Los primeros Western blots de callos se corrieron usando el sistema Bio–Rad Criterion™ (4–20% de geles de Tris–HCl [Bio–Rad, Hercules, CA] y 1X de búfer de corrida de Tris/glicina/SDS). Sin embargo, debido a la baja calidad gel a gel, se tomó la decisión de cambiar al sistema de Invitrogen especificado antes. Luego de la transferencia, las membranas se bloquearon durante 30 minutos a temperatura ambiente en búfer de bloqueo Western Breeze (Invitrogen). La solución de bloqueo se eliminó, y los anticuerpos primarios (MAB anti–TcdA 148G4.1 y MAB anti–TcdA 148D11.1) se agregaron a una concentración de 1,0 µg/ml en búfer de bloqueo. Las membranas se incubaron durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 3 veces, durante 5 minutos cada vez, con solución de lavado Western Breeze™ (Invitrogen). El anticuerpo secundario (HRP anti–ratón [Sigma, St. Louis, MO]) se preparó en solución de bloqueo a una dilución de 1:3000. Las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente antes del lavado, como antes. El exceso de búfer de lavado se eliminó de las membranas por presión

suave del borde de la membrana con toallas de papel. Las membranas se expusieron a sustrato quimioluminiscente (Thermo Scientific) durante 5 minutos. El exceso de sustrato se eliminó como antes, y las membranas se envolvieron en plástico. En un cuarto oscuro, la película radiográfica (Thermo Scientific, Waltham, MA) se expuso a las membranas para visualizar las bandas. Las películas se revelaron durante exposiciones de películas de 5 minutos y 2 horas.

Expresión de proteínas por ELISA en material de plantas T0. El material de hojas de maíz se analizó para detectar la presencia de TcdA usando ELISA mono-mono. Las hojas de plantas cultivadas en invernadero se muestrearon cortando una pieza de hoja de 2 cm de la punta de la primera hoja totalmente expandida, una semana después de que las plantas fueran infestadas con huevos de gusano de la raíz. Las muestras se recolectaron en cajas de tubos de agrupamientos de 96 cavidades (Corning) y se congelaron a -80°C . Las muestras se prepararon para extracción agregando 3 perlas de acero (3,5 mm, Bio Spec Products, Bartlesville, OK), 1 perla de acero (4,5 mm Daisy) y 100 μl de búfer de extracción PBEX (19 mM de NaH_2PO_4 , 31 mM de Na_2HPO_4 , 10 mM de 0,5M EDTA y 0,1% Triton[®]-X 100). Las muestras se pulverizaron usando el Kleco Beadmill[™] (Garcia Machine) durante 3 minutos a máxima velocidad. Se agregó un adicional de 300 μl de búfer de extracción PBEX a las muestras, y éstas se procesaron durante 1 minuto más. Luego del procesamiento, las muestras se centrifugaron a 3000 rcf durante 5 minutos en una centrífuga de placas (Qiagen). El sobrenadante resultante se transfirió a nuevos tubos. Las placas de ELISA fueron preparadas por Beacon Analytical Systems (Portland, ME) de la siguiente manera: las placas Maxisorb[™] (Thermo Fisher Scientific) se recubrieron con un anticuerpo monoclonal anti-TcdA (MAB anti-TcdA 148G4.1) a una concentración de 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 1X PBS. Luego de la incubación hasta el día siguiente a 4°C , las placas se bloquearon con 1% de gelatina de pez de agua fría (Sigma) en PBST (PBS + 0,5% Tween[®]-20). Las placas se secaron y se envolvieron individualmente para su almacenamiento. Al momento del análisis, las placas se calentaron hasta temperatura ambiente y se lavaron 4 veces en una lavadora de placas (TomTec) usando 350 μl de

PBST por lavado, antes de cargar las muestras. Un antígeno de referencia de proteína purificada (PA1, 0,4 mg/ml) se diluyó en búfer PBEX hasta 150 ng/ml y se usó para generar una curva estándar de diluciones en serie desde 150 ng/ml hasta 2,34 ng/ml. Las muestras se diluyeron en búfer PBEX hasta una dilución inicial de 1:8 y se diluyeron en serie 3 veces más. A continuación, se cargó 100 µl de todas las diluciones de estándares y muestras por duplicado en la placa de ELISA. Las muestras se incubaron en las placas de ELISA a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de la incubación, las placas se lavaron como antes. Un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano (MAB anti-TcdA 148D11.1 — HRP) (preparado por Covance, Denver, PA) se diluyó hasta 1 µg/ml en PBS y se agregó a las placas a razón de 100 µl por cavidad. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de la incubación, las placas se lavaron. La pila de placas se rotó 180° y se repitió el paso de lavado. A continuación, se agregó sustrato 1-Step Ultra TMB™ (Thermo Scientific) a las placas a razón de 100 µl por cavidad. Cuando las cavidades con menor dilución de la curva estándar comenzaron a mostrar un color azul, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de solución de detención (0,4 N H₂SO₄). Las placas se leyeron en un lector de placas (Molecular Devices) usando SoftMax® Pro v5 (Molecular Devices) a una longitud de onda de 450 nm menos una referencia de 650 nm. La concentración de TcdA de las muestras de ensayo se calculó por regresión lineal de una curva estándar cuadrática.

La proteína soluble total en los extractos de hojas se determinó mediante el ensayo de Bradford. Las muestras de hojas de maíz se diluyeron usando agua Milli-Q® en una placa de polipropileno de 96 cavidades (Corning). Un estándar de proteína (estándares de ensayo de proteína pre-diluida: BSA [Thermo Scientific]) se diluyó hasta una concentración inicial de 0,5 mg/ml y se diluyó adicionalmente en serie la placa hasta 0,0625 mg/ml, dejando las cavidades inferiores como blanco de agua. Las muestras se transfirieron a una placa Maxisorb® (Thermo Fisher Scientific), y se agregó tinción de proteína preparada (BioRad) a las cavidades. Las placas se leyeron en un lector de placas (Molecular Devices) usando SoftMax® Pro v5 (Molecular Devices) a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteína soluble total se calculó

por regresión lineal de una curva estándar cuadrática. El análisis estadístico se llevó a cabo usando software JMP (versión 7.0.2, SAS Industries, Inc., Cary, NC). Los valores de expresión de proteínas (partes por millón de TcdA) se transformaron usando una transformación $\log+1$.

El ELISA de la presente usó dos anticuerpos monoclonales que sólo podían reconocer un epítipo por anticuerpo, con lo cual se reduce la capacidad del ensayo para reconocer TcdA truncado. Debido a esta especificidad, se confía en que los niveles de expresión determinados por el ELISA representan el TcdA de longitud completa. Dado que la menor dilución del extracto de muestras de hoja es de 1:8, esto da por resultado un límite inferior de detección de 16 ng/ml y un límite inferior de cuantificación (menor factor de dilución x menor estándar que tiene una O.D. de 2 veces el fondo) de 36 ng/ml. De esta forma, todo resultado entre 36 ng/ml y cero no debe considerarse preciso.

Expresión de proteínas por ELISA en material de plantas T1. Como método de detección no destructivo, las plantas de maíz fueron analizadas para detectar la presencia del marcador seleccionable fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) mediante un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) cualitativo. Las hojas de plantas cultivadas en invernadero se muestrearon cortando una pieza de hoja de 2 cm de la punta de la primera hoja totalmente expandida. Las muestras se recolectaron en cajas de tubos de agrupamientos de 96 cavidades (Corning) y se congelaron a -80°C . Las muestras se prepararon para extracción agregando 2 perlas de acero (4,5 mm, Daisy, Rogers AR) y 100 μl de solución salina abuferada con fosfato con búfer de extracción de 0,5% Tween®-20 (PBST). Las muestras se pulverizaron usando el Kleco Beadmill™ (Garcia Machine) durante 3 minutos a máxima velocidad. Se agregó un adicional de 300 μl de búfer de extracción PBST a las muestras, y éstas se procesaron durante 1 minuto más. Luego del batido con perlas, las muestras se centrifugaron a 3000 rcf durante 5 minutos en una centrífuga de placas (Qiagen). El sobrenadante resultante se transfirió a nuevos tubos. Las placas de ELISA del PAT kit AP014 (EnviroLogix, Portland, ME) se calentaron hasta temperatura ambiente en preparación para su uso. Un

antígeno de referencia de proteína purificada (PAT Standard, TSN 104799, 63 µg/ml) se diluyó en búfer PBST hasta 10 ng/ml y se usó para generar una curva estándar de las siguientes diluciones: 5 ng/ml, 0,625 ng/ml y 0,156 ng/ml. Para preparar las placas para usar, se agregó 50 µl de conjugado de enzima (EnviroLogix, Portland, ME) a cada cavidad, seguido por 50 µl de PBST. A continuación, se cargó 50 µl de los estándares y muestras en la placa de ELISA, en sus respectivas cavidades, y se dejó incubar a temperatura ambiente durante una hora. Luego de la incubación, las placas se lavaron cuatro veces en una lavadora de placas (TomTec) usando 350 µl de PBST por lavado. Se agregó sustrato EnviroLogix TMB™ a las placas a razón de 100 µl por cavidad y se dejó incubar durante 15 minutos. La reacción se detuvo agregando 100 µl de solución de detención. Las placas se leyeron en un lector de placas (Molecular Devices) usando SoftMax® Pro v5 (Molecular Devices) a una longitud de onda de O.D. 450, la OD sustraía fue mayor a 0,7 nm.

Las plantas seleccionadas para el bioensayo de insectos fueron analizadas en cuanto a la presencia de TcdA mediante un ELISA Mono/Mono. Se recolectaron muestras de hojas en dos puntos temporales: una semana después de la infestación con huevos de gusano de raíz y al final del bioensayo (21 días después de la infestación). Las hojas se muestrearon cortando una pieza de hoja de 2 cm de la punta de la primera hoja totalmente expandida. Las muestras se recolectaron en cajas de tubos de agrupamientos de 96 cavidades (Corning) y se congelaron a -80°C. Las muestras se prepararon para extracción agregando 2 perlas de acero (4,5 mm Daisy) y 100 µl de búfer de extracción PBEX (19 mM de NaH₂PO₄, 31 mM de Na₂HPO₄, 10 mM de 0,5M EDTA y 0,1% Triton®-X 100). Las muestras se pulverizaron usando el Kleco Beadmill™ (Garcia Machine) durante 3 minutos a máxima velocidad. Se agregó un adicional de 300 µl de búfer de extracción PBEX a las muestras, y éstas se procesaron durante 1 minuto más. Luego del batido con perlas, las muestras se centrifugaron a 3000 rcf durante 5 minutos en una centrífuga de placas (Qiagen). Se recolectaron muestras de raíz para cada planta al final del bioensayo. Las muestras de raíz (200 mg por planta) se prepararon para la extracción agregando 4 perlas de acero (4,5 mm Daisy) y 400 µl de

búfer de extracción PBEX a un tubo de 2 ml. Las muestras se pulverizaron usando el Kleco Beadmill™ (Garcia Machine) durante 3 minutos a máxima velocidad. Luego del batido con perlas, las muestras se centrifugaron a 3000 rcf durante 5 minutos en una centrífuga de placas (Qiagen). El sobrenadante resultante se transfirió a nuevos tubos. Las placas de ELISA fueron preparadas por Beacon Analytical Systems (Portland, ME) de la siguiente manera: las placas Maxisorb (Thermo Fisher Scientific) se recubrieron con un anticuerpo monoclonal anti-TcdA (MAB anti-TcdA 148G4.1) a una concentración de 1,0 µg/ml en 1X PBS. Luego de la incubación hasta el día siguiente a 4°C, las placas se bloquearon con 1% de gelatina de pez de agua fría (Sigma) en PBST (PBS + 0,5% Tween®-20). Las placas se secaron y se envolvieron individualmente para su almacenamiento. Al momento del análisis, las placas se calentaron hasta temperatura ambiente y se lavaron 4 veces en una lavadora de placas (TomTec) usando 350 µl de PBST por lavado, antes de cargar las muestras.

Un antígeno de referencia de proteína purificada (PA1, 0,4 mg/ml) se diluyó en búfer PBEX hasta 150 ng/ml y se usó para generar una curva estándar de diluciones en serie desde 150 ng/ml hasta 2,344 ng/ml. Las muestras se diluyeron en búfer PBEX hasta una dilución inicial de 1:8 y se diluyeron en serie 3 veces más (1:8, 1:16, 1:32, 1:64). A continuación, se cargó 100 µl de todas las diluciones de estándares y muestras por duplicado en la placa de ELISA. Las muestras se incubaron en las placas de ELISA a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de la incubación, las placas se lavaron como antes. Un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano (MAB anti-TcdA 148D11.1 – HRP) se diluyó hasta 1 µg/ml en PBS y se agregó a las placas a razón de 100 µl por cavidad. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de la incubación, las placas se lavaron con sustrato Step Ultra TMB™ (Thermo Scientific). Esta solución de lavado se agregó a las placas a razón de 100 µl por cavidad. Cuando las cavidades con menor dilución de la curva estándar comenzaron a mostrar un color azul, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de solución de detención (0,4 N H₂SO₄). Las placas se leyeron en un lector de placas (Molecular Devices) usando SoftMax® Pro v5 (Molecular Devices) a una longitud de onda de O.D.

450 nm, con una sustracción de una referencia de 650 nm. La concentración de TcdA de las muestras de ensayo se calculó por análisis de regresión cuadrática.

Luego del bioensayo, un subconjunto de muestras de hojas y raíces se analizaron para detectar la presencia de TcdA por Western blots. Las muestras para Western blot se prepararon mezclando el extracto con una cantidad adecuada de búfer de muestra (búfer de muestra NuPage LDS™ 4X [Invitrogen] con 40 mM de ditioneitol). Se preparó un control positivo de proteína purificada (PA1, 0,4 mg/ml) en búfer de muestra como antes, hasta una concentración de 6,25 ng/μl. A continuación, se colocó 40 μl de cada muestra preparada y de estándar en tubos de PCR (Thermo Scientific) y se calentaron en un termociclador (Applied BioSystems) durante 5 minutos a 90°C. Las muestras se resolvieron en 3–8% de geles de Tris–acetato (Invitrogen) con búfer de corrida de Tris–acetato–SDS (Invitrogen). Además, la cámara de gel interior tenía antioxidante (Invitrogen) agregado al búfer de corrida. Las muestras se cargaron según las especificaciones del gel, con 25 μl de muestra cargados para las muestras de hojas y raíces, 4 μl cargados para el control de proteína purificada (25 ng) y 15 μl de un marcador de peso molecular (SeeBlue Marker™, Invitrogen). Los geles se corrieron a una constante de 150 V durante 75 minutos. Mientras los geles corrían, se prepararon tacos de transferencia y membranas de nitrocelulosa de 0,2 μm (Invitrogen) por inmersión en búfer de transferencia (1X NuPage® Transfer Buffer (Invitrogen) + 10–20% metanol). Luego de resolver las proteínas en el gel, el módulo de blot (Invitrogen) y los geles a transferir se ensamblaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los geles se transfirieron luego a una constante de 45 V durante al menos 1,5 horas (2 horas para 2 geles por módulo de blot). Luego de la transferencia, las membranas se bloquearon durante 30 minutos a temperatura ambiente en búfer de bloqueo Western Breeze® (Invitrogen). La solución de bloqueo se eliminó, y los anticuerpos primarios (MAB anti–TcdA 148G4.1 y MAB anti–TcdA 148D11.1) se agregaron a una concentración de 1,0 μg/ml en búfer de bloqueo. Las membranas se incubaron durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 3 veces, durante 5 minutos cada vez, con solución de lavado Western Breeze® (Invitrogen). El anticuerpo

secundario (HRP anti-ratón (Sigma)) se preparó en solución de bloqueo a una dilución de 1:3000. Las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente antes del lavado, como antes. El exceso de búfer de lavado se eliminó de las membranas por presión suave del borde de la membrana con toallas de papel. Las membranas se expusieron a sustrato quimioluminiscente (Thermo Scientific) durante 5 minutos. El exceso de sustrato se eliminó como antes, y las membranas se envolvieron en plástico. En un cuarto oscuro, la película radiográfica (Thermo Scientific) se expuso a las membranas para visualizar las bandas. Las películas se revelaron durante exposiciones de películas de 5 minutos y 2 horas.

La proteína soluble total en los extractos de hojas y raíces se determinó mediante el ensayo de Bradford. Las muestras de hojas y raíces de maíz se diluyeron usando agua Milli-Q® en una placa de polipropileno de 96 cavidades (Corning). Un estándar de proteína (estándares de ensayo de proteína pre-diluida: BSA™ (Thermo Scientific)) se diluyó hasta una concentración inicial de 0,5 mg/ml y se diluyó adicionalmente en serie la placa hasta 0,0625 mg/ml, dejando las cavidades inferiores como blanco de agua. Las muestras se transfirieron a una placa Maxisorb™ (Thermo Fisher Scientific), y se agregó tinción de proteína preparada (BioRad) a las cavidades. Las placas se leyeron en un lector de placas (Molecular Devices) usando SoftMax® Pro v5 (Molecular Devices) a una longitud de onda de O.D. 595 nm. La concentración de proteína soluble total se calculó por análisis de regresión cuadrática.

El análisis estadístico se llevó a cabo usando software JMP® (versión 7.0.2, SAS Industries, Inc., Cary, NC). Los valores de expresión de proteínas (partes por millón de TcdA) se transformaron usando una transformación log.

Ejemplo 5: Detección de expresión en plantas transgénicas T₀

Análisis de expresión de proteínas en plantas T₀. Los datos de Western blot y ELISA mostraron que los eventos transgénicos pDAS5144 expresaban específicamente la proteína TcdA en los tejidos radiculares. La expresión de TcdA en muestras de callos y de hojas T₀ para los eventos pDAS5144 fue sorprendentemente baja, como se muestra

en la TABLA 2. El perfil de expresión en hojas de maíz de TcdA para los diversos constructos se reporta en partes por millón (PPM). La expresión de TcdA en el constructo pDAS5144 fue significativamente menor que en los otros constructos. La expresión promedio de TcdA en los constructos pDAS5144 fue de 14 PPM. El rango de expresión para el material de hojas a partir de este constructo fue de 0–200 PPM. El menor nivel de expresión en tejido de hoja es consecuencia de la especificidad del tejido promotor.

TABLA 2: Expresión de proteína TcdA en hojas T0 y callos de maíz por constructo

	Constructo	Número de eventos	Número positivo	% positivo	Rango de PPM en hojas	PPM promedio	PPM promedio cuartil superior	Comparación media Tukey–Kramer*	Log+1 Mn PPM
Expresión en hojas	pDAS5128	114	—	—	0–650	81	250	A	1,00
	pDAS5143	127	—	—	0–850	64	220	A	0,85
	pDAS5144	123	—	—	0–200	14	60	B	0,41
Expresión en callos	pDAS5128	165	86	52%	—	—	—	—	—
	pDAS5143	97	33	34%	—	—	—	—	—
	pDAS5144	105	11	10%	—	—	—	—	—

*Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Análisis de expresión de proteínas en plantas T1. La TABLA 3 enumera los resultados del análisis ELISA cuantitativo para la proteína TcdA aislada de hojas de maíz T1 una semana después de la infestación durante un bioensayo de insectos. Las hojas de maíz T1 para los diversos eventos fueron cosechadas y presentadas para el bioensayo de insectos a fin de evaluar la eficacia de la proteína TcdA expresada. La expresión promedio de TcdA (PPM) se registró por constructo, con rango y resultados

del cuartil superior. Asimismo, el resultado del análisis de separación de media de Tukey–Kramer para la expresión promedio de TcdA en hojas de maíz se reporta para cada serie de eventos. La expresión de proteínas TcdA de plantas que contienen el constructo pDAS5144 fue despreciable en los tejidos de hojas. A pesar de la expresión despreciable de TcdA en hojas de maíz, los resultados del bioensayo indicaron que los eventos pDAS5144 proporcionaron tolerancia a la infestación de insectos (por ejemplo, la infestación de gusanos de la raíz). El análisis de la combinación de los datos del bioensayo y los datos de la expresión de proteínas (a partir de las hojas) no mostró correlación entre la expresión de proteínas en las hojas y los niveles de daño en las raíces por parte de los gusanos de la raíz. El menor nivel de expresión de TcdA en el tejido de hojas, combinado con la expresión de TcdA en las raíces, sugiere que el nuevo elemento regulatorio promotor génico quimérico expresa el transgen *tcdA* de manera específica del tejido radicular.

TABLA 3: Niveles promedio de expresión de proteínas TcdA (ppm) en hojas de maíz, por constructo, para muestras recolectadas durante el bioensayo de insectos

Constructo	Número de eventos	Rango de PPM en hojas	PPM promedio	PPM promedio cuartil superior	Comparación media Tukey–Kramer*	Log+1 Mn PPM
pDAS5128	241	0–686	55	209	B	0,64
pDAS5143	73	0–789	141	452	A	1,06
pDAS5144	99	0–102	2	8	C	0,04

*Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Análisis de expresión de proteínas luego del bioensayo de insectos. Se usaron ELISA y Western blots para analizar un subconjunto de material de hojas y raíces luego de completados los experimentos de bioensayo de insectos. Las TABLAS 4 y 5 enumeran

la expresión de proteína TcdA promedio en material de hojas y raíces, respectivamente. Aunque hubo significativas diferencias en los niveles de expresión de proteína TcdA en hojas de maíz T1 entre constructos, las diferencias entre constructos fueron menos distinguidas en raíces analizadas luego del bioensayo de insectos, en comparación con las hojas. Los eventos pDAS5144 produjeron el mayor rango de expresión de proteína TcdA, lo que causa la expresión de proteína TcdA en los eventos transgénicos que se sometieron a ensayo. Comparativamente, de la proteína total recuperada, no hubo proteína TcdA detectable en los tejidos de hojas. Estos resultados sugieren además que la expresión del transgen a partir del constructo pDAS5144, en el cual TcdA es impulsada por los nuevos elementos regulatorios promotores génicos quiméricos, es específica de la raíz.

TABLA 4: Expresión de proteína TcdA (PPM) en hojas de maíz, por constructo, luego de completado el bioensayo de insectos

Constructo	Número de eventos en hojas	Rango de PPM en hojas	PPM promedio en hojas	PPM promedio en hojas cuartil superior	Comparación media Tukey–Kramer*	Log+1 Mn PPM
pDAS5128	33	0–468	79	147	B	1,26
pDAS5143	18	0–872	389	590	A	2,25
pDAS5144	56	0	0	0	C	0,00

* Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

TABLA 5: Expresión de proteína TcdA (PPM) en raíces de maíz, por constructo, luego de completado el bioensayo de insectos

Constructo	Número de eventos en raíces	Rango de PPM en raíces	PPM promedio en raíces	PPM promedio en raíces cuartil superior	Comparación media Tukey–Kramer*	Log+1 Mn PPM
pDAS5128	33	0–1401	389	840	AB	2,10
pDAS5143	18	0–1200	449	885	AB	2,21
pDAS5144	56	0–1393	252	606	B	1,56

* Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Expresión de proteínas en las etapas V6 y VT de desarrollo. Se realizaron otros estudios para evaluar los niveles de expresión de TcdA por los nuevos elementos regulatorios promotores génicos quiméricos en las etapas V6 y VT del desarrollo de la planta de maíz. Las plantas de maíz se cultivaron expresando el transgen TcdA a partir de cada uno de los constructos 5116, 5117 y 5144. La proteína se aisló en el tejido de hoja T1 y se cuantificó, y estos resultados se compararon con la proteína total aislada de la planta entera. Estos resultados, como se muestra en la TABLA 6, confirman adicionalmente que la expresión del transgen *tcdA* a partir de los nuevos elementos regulatorios promotores génicos quiméricos del constructo pDAS5144 es específica de la raíz. La proteína TcdA fue detectada a partir de la proteína total aislada de plantas enteras, pero no se detectó proteína TcdA en las hojas. Además, los nuevos elementos regulatorios promotores génicos quiméricos del constructo pDAS5144 expresaron el transgen *tcdA* en ambas etapas V6 y VT de crecimiento y desarrollo del maíz.

TABLA 6: Proteína TcdA total a partir de hojas de maíz T1 cosechadas en las etapas V6 y VT del crecimiento y desarrollo de las plantas

Constructo	N de hojas	Expresión media en hojas en V6 en PPM	Expresión media en hojas en VT en PPM	N de raíces	Expresión media en raíces en V6 en PPM	Expresión media en raíces en VT en PPM
pDAS5128	96	90	114	68	149	179
pDAS5143	84	439	67	57	106	101
pDAS5144	49	0,0	0,0	34	28,0	12,0

Dichos nuevos elementos regulatorios promotores génicos quiméricos se unieron operativamente y se usaron para expresar un transgen como casete de expresión génica, y se caracterizó el perfil de expresión resultante. Por primera vez se divulga un promotor quimérico que comprende una secuencia de polinucleótidos promotora corriente arriba que fue obtenida a partir de peroxidasa 5 de *Zea mays*, seguido por el intrón 6 de alcohol deshidrogenasa (I) de *Zea mays* y 5'-UTR del virus de la veta del maíz, para usar en constructos de expresión génica. Los constructos que expresan los nuevos elementos regulatorios promotores génicos quiméricos demostraron expresar un transgen de manera específica del tejido radicular. Los resultados de especificidad tisular son sorprendentes, dado que un promotor quimérico que comprende una secuencia de polinucleótidos promotora corriente arriba que se obtuvo de peroxidasa 5 de *Zea mays*, seguido por el intrón 1 de alcohol deshidrogenasa de *Zea mays*, expresó un transgen en tejidos tanto de hoja como de raíz. Véase la Tabla 22 de la Patente de EE.UU. Nro. 6.384.207.