

PROMOTOR BIDIRECCIONAL SINTÉTICO DE PLANTAS

Reclamo de prioridad

La presente invención reclama el beneficio de la fecha de
5 presentación de la solicitud de patente provisional de EE.UU. No.
62/078,214, presentada el 11 de Noviembre de 2014, titulada
“PROMOTOR BIDIRECCIONAL SINTÉTICO DE PLANTAS”.

Campo de la invención

La presente descripción se refiere generalmente a composiciones
10 y métodos para promover la transcripción de una secuencia
nucleotídica en una planta o célula de planta. Algunas modalidades se
refieren a un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz
(Rubi3) que funciona en plantas para promover la transcripción de una
secuencia nucleotídica enlazada operativamente. Las modalidades
15 particulares se refieren a métodos que incluyen un promotor sintético
(por ejemplo, para introducir una molécula de ácido nucleico en una
célula) y células, cultivos celulares, tejidos, organismos y partes de
organismos que comprenden un promotor sintético, así como productos
producidos a partir del mismo.

20 Antecedentes de la invención

Muchas especies vegetales son capaces de ser transformadas
con transgenes de otras especies para introducir rasgos o
características agronómicamente deseables, por ejemplo, mejorar la
calidad del valor nutricional, aumentar el rendimiento, conferir
25 resistencia a plagas o enfermedades, aumentar la tolerancia a sequía y

al estrés, mejorar las cualidades hortícolas (tales como pigmentación y crecimiento), conferir resistencia a los herbicidas, permitir la producción de compuestos y/o materiales industriales útiles y/o permitir la producción de productos farmacéuticos. La introducción de transgenes en células de plantas y la posterior recuperación de plantas transgénicas fértiles que contienen una copia establemente integrada del transgén puede dar como resultado la producción de plantas transgénicas que poseen los rasgos o características deseables.

El control y la regulación de la expresión génica pueden ocurrir a través de varios mecanismos. La iniciación de la transcripción de un gen es un mecanismo de control predominante de la expresión génica. La iniciación de la transcripción se controla generalmente por secuencias polinucleotídicas localizadas en la región 5'-flanqueante o región corriente arriba del gen transcrito. Estas secuencias se denominan colectivamente promotores. Los promotores generalmente contienen señales para que la ARN polimerasa comience la transcripción para que se pueda producir el ARN mensajero (ARNm). El ARN maduro se transcribe por ribosomas, sintetizando de esta manera las proteínas. Las proteínas de unión al ADN interactúan específicamente con secuencias de ADN promotor para promover la formación de un complejo transcripcional e iniciar el proceso de expresión génica. Hay una variedad de promotores eucariotas aislados y caracterizados de plantas que son funcionales para impulsar la expresión de un transgén en plantas. Los promotores que afectan la expresión génica en respuesta a estímulos, la disponibilidad de

nutrientes o condiciones adversas como choque térmico, anaerobiosis o presencia de metales pesados han sido aislados y caracterizados. Asimismo hay promotores que controlan la expresión génica durante el desarrollo o en un tejido u órgano de manera específica. Además, se
5 han caracterizado y aislado los promotores procariotas aislados de bacterias y virus que son funcionales para impulsar la expresión de un transgén en plantas.

Un promotor típico que es capaz de expresión en un eucariota consta de un promotor mínimo y otros elementos *cis*. El promotor
10 mínimo es esencialmente una región de caja TATA donde la ARN polimerasa II (polII), la proteína de unión a TATA (TBP) y los factores asociados a TBP (TAF) se pueden unir para iniciar la transcripción. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se requieren elementos de secuencia distintos del motivo TATA para una transcripción exacta. Se
15 ha descubierto que tales elementos de secuencia (por ejemplo, potenciadores) elevan el nivel global de expresión de los genes cercanos, a menudo de una manera independiente de la posición y/o la orientación. Otras secuencias próximas al sitio de inicio de la transcripción (por ejemplo, secuencias INR) de algunos genes de polII
20 pueden proporcionar un sitio de unión alternativo para factores que también contribuyen a la activación transcripcional, incluso proporcionando alternativamente los sitios de unión del promotor central para la transcripción en promotores que carecen de elementos TATA funcionales. Zenzie-Gregory *et al.* (1992) J. Biol. Chem. 267:
25 2823-30.

Otros elementos reguladores de genes incluyen secuencias que interactúan con factores de unión al ADN específicos. Estos motivos de secuencia se denominan a veces elementos *cis* y son usualmente dependientes de la posición y la orientación, aunque se pueden encontrar en 5' o 3' con la secuencia codificadora de un gen o en un intrón. Tales elementos *cis*, a los cuales se unen los factores de transcripción específicos de tejido o de desarrollo específicos, individualmente o en combinación, pueden determinar el patrón de expresión espaciotemporal de un promotor a nivel transcripcional. La disposición de los elementos *cis* corriente arriba, seguida por un promotor mínimo, establece típicamente la polaridad de un promotor particular. Los promotores de plantas que han sido clonados y ampliamente utilizados tanto para la investigación básica como para la aplicación biotecnológica son generalmente unidireccionales, dirigiendo solamente un gen que se ha fusionado en su extremo 3' (es decir, corriente abajo). Ver Xie *et al.* (2001) Nat. Biotechnol. 19 (7): 677-9; Patente de EE.UU. 6,388,170.

Se han identificado muchos elementos *cis* (o "secuencias reguladoras corriente arriba") en promotores de plantas. Estos elementos *cis* varían ampliamente en el tipo de control que ejercen sobre los genes enlazados operativamente. Algunos elementos actúan para aumentar la transcripción de genes enlazados operativamente en respuesta a respuestas ambientales (por ejemplo, temperatura, humedad y heridas). Otros elementos *cis* pueden responder a señales de desarrollo (por ejemplo, germinación, maduración de semilla y

floración) o a información espacial (por ejemplo, especificidad de tejido). Ver, por ejemplo, Langridge *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3219-23. El tipo de control de elementos promotores específicos es típicamente una calidad intrínseca del promotor; es
 5 decir, un gen heterólogo bajo el control de tal promotor es probable que se exprese de acuerdo con el control del gen nativo del que se aisló el elemento promotor. *Id.* Estos elementos también pueden ser intercambiados típicamente con otros elementos y mantener su control intrínseco característico sobre la expresión génica.

10 A menudo es necesario introducir genes múltiples en las plantas para la ingeniería metabólica y el apilamiento de rasgos, genes que son controlados con frecuencia por promotores idénticos u homólogos. Sin embargo, el silenciamiento de genes basado en homología (HBGS, por sus siglas en inglés) es probable que surja cuando múltiples
 15 transgenes introducidos tienen promotores homólogos que los dirigen. Mol *et al.* (1989) Plant Mol. Biol. 13: 287-94. Por lo tanto, se ha informado que el HBGS se produce extensamente en plantas transgénicas. Ver, por ejemplo, Vaucheret y Fagard (2001) Trends Genet. 17: 29-35. Se han sugerido varios mecanismos para explicar los
 20 fenómenos de HBGS, todos incluyen la característica de que la homología de secuencias en el promotor desencadena mecanismos de reconocimiento celular que resultan en el silenciamiento de los genes repetidos. Matzke y Matzke (1995) 47:23-48; Fire (1999) Trends genet. 15:358-63; Hamilton y Baulcombe (1999) Science 286:950-2; Steimer *et al.* (2000) Plant Cell 12:1165-78. Además, el uso repetido del mismo
 25

promotor para obtener niveles similares de patrones de expresión de diferentes transgenes puede resultar en un exceso de sitios de unión a factores de transcripción (TF) en promotores repetidos puede causar el agotamiento de los TF endógenos y conducir a una regulación transcripcional baja.

Dado que existe una necesidad cada vez mayor de integración de rasgos multigénicos que se expresan de forma robusta, en un solo locus de un evento transgénico; las soluciones que proporcionan para reducir los desafíos técnicos asociados con la creación de tales eventos transgénicos son importantes. Más específicamente, son deseables las estrategias para evitar el HBGS en plantas transgénicas que implican el desarrollo de promotores sintéticos que son funcionalmente equivalentes pero tienen una homología de secuencia mínima. Cuando tales promotores sintéticos se usan para expresar transgenes en plantas de cultivo, los mismos pueden ayudar a evitar o reducir el HBGS. Mourrain *et al.* (2007) *Planta* 225 (2): 365-79; Bhullar *et al.* (2003) *Plant Physiol.* 132:988-98.

Descripción de la invención

En modalidades de la presente invención, la descripción se refiere a un promotor polinucleotídico bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz que comprende una pluralidad de elementos promotores de un promotor de ubiquitina-3 de arroz y un promotor de ubiquitina-1 de *Zea mays*. En otra modalidad, la descripción en cuestión comprende varios elementos promotores. Por consiguiente, los elementos promotores comprenden un intrón. En algunos casos, los

elementos promotores comprenden una 5'-UTR. Además, los elementos promotores comprenden un elemento promotor corriente arriba. Además, los elementos promotores comprenden un promotor de núcleo mínimo. En las modalidades de la presente invención, la descripción se

5 refiere a un método para producir una célula de planta transgénica, que comprende las etapas de: a) transformar una célula de planta con un casete de expresión génica que comprende un promotor polinucleotídico bidireccional de ubiquitina-3 enlazado operativamente al menos a una secuencia polinucleotídica de interés; b) aislar la célula

10 de planta transformada que comprende el casete de expresión génica; y c) producir una célula de planta transgénica que comprende el promotor polinucleotídico bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz enlazado operativamente al menos a una secuencia polinucleotídica de interés. En las modalidades de la presente

15 invención, la descripción se refiere a un método para expresar una secuencia polinucleotídica de interés en una célula de planta, el método comprende introducir en la célula de planta la secuencia polinucleotídica de interés enlazada operativamente a un promotor polinucleotídico biodegradable bidireccional sintético de ubiquitina-3 de

20 arroz. En modalidades de la descripción objeto de la invención, la descripción se refiere a una célula de planta transgénica que comprende el promotor polinucleotídico bidireccional sintético ubiquitina-3 de arroz.

Las anteriores y otras características se harán más evidentes a

25 partir de la siguiente descripción detallada de varias modalidades, que

prosigue con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Mapa del plásmido pDAB113122.

Figura 2: Mapa de plásmido pDAB113142.

5 Figura 3: Una gráfica de la expresión de Cry34 en tejido de hoja V6 de plantas de maíz transformadas con el constructo pDAB113122 o pDAB113142.

Figura 4: Una gráfica de la expresión de Cry35 en tejido de hoja V6 de plantas de maíz transformadas con el constructo pDAB113122 o
10 pDAB113142.

Figura 5: Una gráfica de expresión de AAD-1 en tejido de hoja V6 de plantas de maíz transformadas ya sea con el constructo pDAB113122 o pDAB113142.

Modalidades de ejecución de la invención

15 *I. Breve descripción de varias modalidades*

El desarrollo de plantas transgénicas es cada vez más complejo y típicamente requiere apilar múltiples transgenes en un solo locus. Ver Xie *et al.* (2001) Nat. Biotechnol. 19(7): 677-9. Dado que cada transgén requiere habitualmente un promotor único para la expresión, se
20 requiere que múltiples promotores expresen diferentes transgenes dentro de un apilamiento de genes. Además de aumentar el tamaño del apilamiento de genes, esto conduce con frecuencia al uso repetido del mismo promotor para obtener niveles similares de patrones de expresión de diferentes transgenes. Este enfoque es a menudo
25 problemático, ya que la expresión de múltiples transgenes impulsado

por el mismo promotor puede conducir a silenciamiento de genes o HBGS. Un exceso de sitios de unión al factor de transcripción (TF) en promotores repetidos puede causar agotamiento de TF endógenos y llevan a regulación transcripcional baja. El silenciamiento de transgenes es indeseable para el rendimiento de una planta transgénica producida para expresar los transgenes. Las secuencias repetitivas dentro de un transgén a menudo conducen a recombinación homóloga intra-locus resultando en reordenamientos de polinucleótidos y fenotipos indeseables o rendimiento agronómico.

Los promotores de plantas utilizados para la investigación básica o la aplicación biotecnológica son generalmente unidireccionales y regulan sólo un gen que se ha fusionado en su extremo 3' (corriente abajo). Para producir plantas transgénicas con diversos rasgos o características deseadas, sería útil reducir el número de promotores que se despliegan para impulsar la expresión de los transgenes que codifican los rasgos y características deseados. Especialmente en aplicaciones en las cuales es necesario introducir múltiples transgenes en las plantas para la ingeniería metabólica y el apilamiento de rasgos, se necesitan múltiples promotores para impulsar la expresión de múltiples transgenes. Mediante el desarrollo de un solo promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz que puede impulsar la expresión de dos transgenes que flanquean el promotor, el número total de promotores necesarios para el desarrollo de cultivos transgénicos se puede reducir, disminuyendo de esta manera el uso repetido del mismo promotor, reduciendo el tamaño de los constructos

transgénicos, y/o reduciendo la posibilidad de HBGS. Dicho promotor puede ser generado introduciendo elementos *cis* conocidos en una secuencia nueva o sintética de ADN o en forma alternativa mediante "intercambio de dominio", donde los dominios de un promotor se
5 reemplazan con dominios funcionalmente equivalentes de otros promotores heterólogos.

Las modalidades de la presente invención utilizan un proceso en el cual se utilizó un promotor unidireccional de un gen de ubiquitina-3 *Oryza sativa* (Arroz) (por ejemplo, Rubi3) para diseñar un promotor
10 bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz, para que un promotor pueda dirigir la expresión de dos genes, uno en cada extremo del promotor. Los promotores bidireccionales sintéticos ubiquitina-3 de arroz pueden permitir a los expertos en la técnica apilar los transgenes en células de plantas y plantas mientras se reduce el uso repetido del
15 mismo promotor y se reduce el tamaño de los constructos transgénicos. Además, la regulación de la expresión de dos genes con un único promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz puede proporcionar también la capacidad para co-expresar los dos genes en las mismas condiciones, tal como puede ser útil, por ejemplo, cuando
20 cada uno de los dos genes contribuye a un solo rasgo en el huésped. En algunos casos se ha descrito el uso de la función bidireccional de los promotores en las plantas, incluyendo el promotor de la ubiquitina-1 de *Zea mays* (Publicación de patente internacional No. WO2013101343 A1), promotores de CaMV 35 (Barfield y Pua (1991) Plant Cell Rep.
25 10(6-7): 308-14, Xie *et al.* (2001), *supra*), y los promotores *mas* (Velten

et al., (1984) EMBO J. 3(12):2723-30; Langridge *et al.* (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:3219-23).

La iniciación de la transcripción y la modulación de la expresión de genes en genes de plantas se dirigen mediante una variedad de
5 elementos de secuencia de ADN que están colectivamente dispuestos dentro del promotor. Los promotores eucariotas consisten en un elemento promotor de núcleo mínimo (minP), y secuencias reguladoras adicionales corriente arriba (URS). El elemento promotor del núcleo es un tramo mínimo de la secuencia de ADN contiguo que es suficiente
10 para dirigir el inicio exacto de la transcripción. Los promotores del núcleo en las plantas también comprenden regiones canónicas asociadas con el inicio de la transcripción, tales como cajas CAAT y TATA. El elemento de caja TATA se encuentra usualmente aproximadamente de 20 a 35 nucleótidos corriente arriba del sitio de
15 iniciación de la transcripción.

La activación de la minP es dependiente de la URS, a la cual se unen varias proteínas y posteriormente interactúan con el complejo de iniciación de la transcripción. Las URS comprenden secuencias de ADN, que determinan el patrón de expresión espaciotemporal de un
20 promotor que comprende la URS. La polaridad de un promotor se determina a menudo por la orientación del minP, mientras que la URS es bipolar (es decir, funciona independientemente de su orientación).

En ejemplos específicos de algunas modalidades, se utiliza un elemento promotor de núcleo mínimo (minUbi10P) de un promotor de
25 ubiquitina-1 de *Zea mays* modificado (ZmUbi1) derivado originalmente

de *Zea mays*, para diseñar un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz que funciona en plantas para proporcionar características de control de expresión que son únicas con respecto a promotores bidireccionales previamente descritos. Las modalidades
5 incluyen un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz que además incluye una secuencia nucleotídica de elemento promotor de núcleo mínimo derivado de un promotor nativo de ubiquitina-1 de *Zea mays* (minPZmUbi1).

El promotor ZmUbi1 originalmente derivado de *Zea mays* c.v. B73
10 comprende secuencias situadas en el genoma del maíz dentro de aproximadamente 899 bases 5' del sitio de inicio de la transcripción, y además dentro de aproximadamente 1,093 bases 3' del sitio de inicio de la transcripción. Christensen *et al.* (1992) Plant Mol. Biol. 18 (4): 675-89 (que describe un gen de *Zea mays* c. v. B73 ZmUbi1). Un
15 promotor ZmUbi1 modificado derivado de B73 que se usa en algunos ejemplos es un promotor de aproximadamente 2 kb que contiene una caja TATA; dos elementos de consenso de choque térmico superpuestos; una secuencia líder de 82 o 83 nucleótidos (dependiendo de la cadena de referencia) inmediatamente adyacente al sitio de inicio
20 de la transcripción, que se denomina aquí exón ZmUbi1 y un intrón de 1,015-1,016 nucleótidos. Otras variantes del promotor de la ubiquitina del maíz derivadas de las especies *Zea* y los genotipos de *Zea mays* pueden presentar una alta conservación de la secuencia alrededor del elemento minP que consiste en el elemento TATA y los elementos en
25 consenso del choque térmico corriente arriba. Por lo tanto, las

modalidades de la invención se ejemplifican mediante el uso de esta región corta (~200 nt) altamente conservada (por ejemplo, SEC ID NO: 2) de un promotor ZmUbi1 como elemento promotor de núcleo mínimo para construir promotores de plantas bidireccionales sintéticos.

- 5 El promotor de ubiquitina-3 de arroz originariamente derivado de *Oryza sativa* comprende secuencias situadas en el genoma del arroz dentro de aproximadamente 1,990 bases 5' del sitio de inicio de la transcripción. E Sivamani y R Qu (2006) Expression enhancement of a rice polyubiquitin promoter. Plant Molecular Biology 60:225-239. Un
- 10 promotor de ubiquitina-3 de arroz modificado derivado de *Oryza sativa* que se usa en algunos ejemplos es un promotor de aproximadamente 2 kb que contiene una caja TATA, una secuencia 5' UTR/intrón y un elemento de mejora corriente abajo situado al inicio de la secuencia de codificación de ubiquitina-3 de arroz. Otras variantes del promotor de
- 15 ubiquitina-3 derivadas de genotipos de las especies *Oryza* y *Oryza sativa* pueden mostrar una alta conservación de secuencia alrededor de estos elementos promotores.

II. Abreviaciones

	AtUbi10	Ubiquitina 10 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
20	BCA	Ácido bicinconínico
	CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
	CsVMV	Virus del mosaico de la vena de yuca
	CTP	Péptido de tránsito al cloroplasto
	HBGS	Silenciamiento de genes basado en homología
25	minUbi1P	Promotor de núcleo mínimo de ZmUbi1

	OLA	Amplificación de ligación de oligonucleótidos
	PCR	Reacción en cadena de polimerasa
	RCA	Amplificación en círculo rodante
	RUBi3	Ubiquitina 3 de arroz
5	RT-PCR	PCR de transcriptasa inversa
	SNuPE	Extensión de cebador de nucleótido individual
	URS	Secuencia reguladora corriente arriba
	ZmUbi1	Ubiquitina 1 de <i>Zea mays</i>

III. Términos

10 A lo largo de la solicitud, se utilizan una serie de términos. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de la especificación y las reivindicaciones, incluyendo el alcance que otorga tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones:

Intrones: Tal como se utiliza en la presente descripción, el
 15 término intrón se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico comprendida en un gen (o secuencia polinucleotídica expresada de interés) que se transcribe pero no se traduce. Los intrones incluyen una secuencia de ácido nucleico no traducida dentro de una secuencia expresada de ADN, así como la secuencia correspondiente en
 20 moléculas de ARN transcritas de la misma.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o una proteína), se ha separado sustancialmente, se produce aparte o se purifica lejos de otros componentes biológicos en la célula del organismo en la cual el componente se produce naturalmente (es
 25 decir, otro componente cromosómico y ADN y ARN extra-

cromosómicos, y proteínas), mientras que efectúa un cambio químico o funcional en el componente (por ejemplo, un ácido nucleico se puede aislar de un cromosoma rompiendo enlaces químicos que conectan el ácido nucleico con el ADN restante en el cromosoma). Las moléculas de ácido nucleico y las proteínas que han sido "aisladas" incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas por métodos de purificación estándar. El término también abarca los ácidos nucleicos y las proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula huésped, así como moléculas idénticas, proteínas y péptidos nucleicos sintetizados químicamente.

Expresión génica: El proceso mediante el cual la información codificada de una unidad transcripcional de ácido nucleico (incluyendo, por ejemplo, ADN genómico) se convierte en una parte operativa, no operativa o estructural de una célula, incluyen a menudo la síntesis de una proteína. La expresión génica puede estar 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 parte de la vía desde ADN a ARN a proteína. La regulación de la expresión génica se produce, por ejemplo, a través de controles que actúan sobre la transcripción, traducción, transporte y procesamiento de ARN, degradación de moléculas intermedias tales como ARNm o a través de la activación, inactivación, compartimentación o degradación de moléculas de proteínas específicas después de haberlas hecho, o por combinaciones de las mismas. La expresión génica se puede medir al

nivel del ARN o al nivel de proteína por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, los ensayos de transferencia de Northern, RT-PCR, transferencia Western o *in vitro*, *in situ* o *in vivo*).

Silenciamiento de genes basado en homología: Como se usa en este documento, el "silenciamiento de genes basado en homología" (HBGS, por sus siglas en inglés) es un término genérico que incluye tanto el silenciamiento de genes transcripcional como el silenciamiento de genes post-transcripcional. El silenciamiento de un locus diana por un locus silenciador no enlazado puede resultar de la inhibición de la transcripción (silenciamiento del gen de transcripción, TGS) o degradación del ARNm (silenciamiento de genes post-transcripcional, PTGS), debido a la producción de ARN bicatenario (dsRNA) correspondiente al promotor o secuencias transcritas, respectivamente. La participación de distintos componentes celulares en cada proceso sugiere que los TGS y PTGS inducidos por el ADN bicatenario probablemente resultan de la diversificación de un antiguo mecanismo común. Sin embargo, una comparación estricta de los TGS y PTGS ha sido difícil de lograr, ya que generalmente se basa en el análisis de distintos loci de silenciamiento. Describimos un solo locus de transgén que desencadena los TGS y PTGS, debido a la producción del ADN bicatenario correspondiente a promotor y secuencias transcritas de diferentes genes diana. Mourrain *et al.* (2007) Plant 225:365-79. Es probable que los siRNA (ARN pequeño de interferencia) sean las moléculas reales que activan los TGS y PTGS en secuencias homólogas: los siRNA en este modelo desencadenarían el

silenciamiento y la metilación de secuencias homólogas en *cis* y en *trans* a través de la diseminación de la metilación de secuencias transgénicas en el promotor endógeno. *Id.*

Molécula de ácido nucleico: Como se utiliza en el presente documento, el término “molécula de ácido nucleico” (o “ácido nucleico” o “polinucleótido”) se puede referir a una forma polimérica de nucleótidos, que puede incluir tanto la cadena sentido como anti-sentido de ARN, ADNc, ADN genómico y formas sintéticas y polímeros mezclados de los anteriores. Un nucleótido se puede referir a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una “molécula de ácido nucleico”, como se utiliza en el presente documento, es sinónimo con “ácido nucleico” y “polinucleótido”. Una molécula de ácido nucleico tiene usualmente al menos 10 bases en longitud, al menos que se especifique lo contrario. El término puede referirse a una molécula de ARN o ADN de longitud no determinada. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias del ADN. Una molécula de ácido nucleico puede incluir tanto nucleótidos que se producen en la naturaleza como los nucleótidos modificados enlazados en conjunto por enlaces de nucleótidos que se producen naturalmente y/o aquellos que no se producen naturalmente.

Las moléculas de ácido nucleico pueden ser modificadas químicamente o bioquímicamente o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, como serán fácilmente apreciadas por los expertos en la técnica. Tales modificaciones

incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas (por ejemplo, enlaces no cargados: por ejemplo fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.,: 5 enlaces cargados, por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.,; restos pendientes: por ejemplo, péptidos, intercaladores: por ejemplo, acridina, psoraleno, etc., quelantes, alquiladores y enlaces modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). El término "molécula de ácido nucleico" también incluye cualquier 10 conformación topológica, incluyendo conformaciones monocatenarias, bicatenarias, parcialmente duplexadas, triplexadas, horadadas, circulares y con candado.

La transcripción continúa en una manera como 5' a 3' a lo largo de una cadena de ADN. Esto significa que el ARN se produce mediante 15 la adición secuencial de ribonucleótido-5'-trifosfatos a los terminales 3' de la cadena en crecimiento (con una eliminación requerida del pirofosfato). En una molécula de ácido nucleico lineal o circular, se pueden denominar elementos discretos (por ejemplo, secuencias nucleotídicas particulares) como "corriente arriba" o "5'" con respecto a 20 otro elemento si están unidos o estarían unidos al mismo ácido nucleico en la dirección 5' desde ese elemento. De manera similar, los elementos discretos pueden estar "corriente abajo" o "3'" con respecto a otro elemento si están o estarían unidos al mismo ácido nucleico en la dirección 3' desde ese elemento.

25 Una "posición" base, tal como se utiliza en la presente

descripción, se refiere a la ubicación de una base o residuo de nucleótido dado dentro de un ácido nucleico designado. El ácido nucleico designado se puede definir por alineación (ver más adelante) con un ácido nucleico de referencia.

5 Hibridación: Los oligonucleótidos y sus análogos se hibridan mediante enlaces de hidrógeno, que incluyen enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, de Hoogsten o de Hoogsten inversa entre bases complementarias. Generalmente, las moléculas de ácido nucleico consisten de bases de nitrógeno que son, ya sea pirimidinas (citosina
10 (C), uracilo (U) y timina (T)) o purinas (adenina (A) y guanina (G)). Estas bases de nitrógeno de los enlaces de hidrógeno entre una pirimidina y una purina y la unión de la pirimidina a purina se denominan "emparejamiento de bases". Más específicamente, A se enlazarán con hidrógeno a T o U y G se enlazarán a C. "Complementario"
15 se refiere al emparejamiento de bases que ocurre entre las secuencias de dos ácidos distintos o dos regiones distintas de la misma secuencia de ácido nucleico.

"Específicamente hibridizable" y "específicamente complementario" son términos que indican un grado suficiente de
20 complementariedad de manera que se produce una unión estable y específica entre el oligonucleótido y la diana de ADN o ARN. El oligonucleótido no necesita ser 100% complementario a su secuencia diana para ser específicamente hibridizable. Un oligonucleótido es específicamente hibridizable cuando la unión del oligonucleótido a la
25 molécula de ADN o ARN diana interfiere con la función normal del ADN

o ARN diana y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido a secuencias no diana bajo 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 lugar a grados particulares de severidad variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación elegido y de la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico hibridantes. Generalmente, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{2+}) del tampón de hibridación contribuirán a la severidad de la hibridación, aunque los tiempos de lavado también influyen en la severidad. Los cálculos relativos a las condiciones de hibridación requeridas para alcanzar grados particulares de severidad se discuten en Sambrook *et al.* (Ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, cap. 9 y 11.

Tal como se utiliza en la presente descripción, las "condiciones severas" abarcan las condiciones bajo las cuales la hibridación sólo se producirá si hay menos de 50% de desajuste entre la molécula de hibridación y la diana de ADN. Las "condiciones severas" incluyen otros niveles particulares de severidad. Por lo tanto, tal como se usa en este documento, las condiciones de "severidad moderada" son aquellas en las cuales las moléculas con más de 50% de desigualdad de secuencia no se hibridarán; las condiciones de "alta severidad" son

aquellas bajo las cuales las secuencias con más de 20% de incompatibilidad no hibridarán y las condiciones de "severidad muy alta" son aquellas bajo las cuales las secuencias con más de 10% de falta de coincidencia no se hibridarán.

- 5 En modalidades particulares, las condiciones severas pueden incluir hibridación a 65°C, seguido por lavados a 65°C con 0.1x SSC/0.1% SDS durante 40 minutos.

Las siguientes son condiciones de hibridación representativas, no limitantes:

- 10 Muy alta severidad: hibridación en tampón SSC 5x a 65°C durante 16 horas; lavar dos veces en tampón SSC 2x a temperatura ambiente durante 15 minutos cada uno y lavar dos veces en tampón SSC 0.5x a 65°C durante 20 minutos cada uno.

- 15 Severidad alta: hibridación en tampón SSC 5x-6x a 65-70°C durante 16-20 horas; lavar dos veces en tampón SSC 2x a temperatura ambiente durante 5-20 minutos cada uno y lavar dos veces en tampón 1x SSC a 55-70°C durante 30 minutos cada uno.

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

- 25 En modalidades particulares, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridizables pueden permanecer unidas bajo condiciones de hibridación de severidad muy alta. En estas y otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico específicamente

hibridizables pueden permanecer unidas bajo condiciones de hibridación de alta severidad. En estas y otras modalidades, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridizables pueden permanecer unidas bajo condiciones de hibridación de severidad moderada.

Oligonucleótido: Un oligonucleótido es un polímero corto de ácido nucleico. Los oligonucleótidos se pueden formar por escisión de segmentos de ácido nucleico más largos o por polimerización de precursores de nucleótidos individuales. Los sintetizadores automatizados permiten la síntesis de oligonucleótidos de hasta varios cientos de pares de bases de longitud. Debido a que los oligonucleótidos se pueden unir a una secuencia nucleotídica complementaria, se pueden usar como sondas para detectar ADN o ARN. Se pueden utilizar oligonucleótidos compuestos de ADN (oligodesoxirribonucleótidos) en PCR, una técnica para la amplificación de secuencias de ADN pequeños. En la PCR, el oligonucleótido se refiere típicamente como un "cebador", que permite que una ADN polimerasa extienda el oligonucleótido y replique la cadena complementaria.

Identidad de secuencia: El término "identidad de secuencia" o "identidad", tal como se utiliza en el presente documento, en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido, se puede referir a los residuos en las dos secuencias que son los mismos cuando están alineados para máxima correspondencia en una ventana de comparación especificada.

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término “porcentaje de identidad de secuencia” se puede referir al valor determinado comparando dos secuencias alineadas óptimamente (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos) en una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales se produce el residuo de nucleótido o aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Los métodos para alinear secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Varios programas y algoritmos de alineación se describen en, por ejemplo: Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Mates.* 2: 482; Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443; Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 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. Una consideración detallada de los métodos de alineación

de secuencias y cálculos de homología se puede encontrar en, por ejemplo, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10.

La Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI) (BLAST, 5 Altschul et al. (1990)) está disponible en varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional de Información Biotecnológica (Bethesda, MD), y en Internet, para su uso en relación con varios programas de análisis de secuencias. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia utilizando este programa está disponible en Internet en la 10 sección "ayuda" de BLAST. Para las comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, la función "secuencias Blast 2" del programa BLAST (Blastn) se puede realizar utilizando los parámetros por defecto. Las secuencias de ácido nucleico con similitud aún mayor con las secuencias de referencia mostrarán un porcentaje de identidad 15 creciente cuando se evalúan mediante este método.

Enlazadas operativamente: Una primera secuencia de ácido nucleico está enlazada operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por 20 ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia de codificación cuando el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificadora. Cuando se producen de manera recombinante, las secuencias de ácido nucleico enlazadas operativamente son generalmente continuas y, en donde sea necesario, 25 para unir dos regiones codificadoras de proteína en el mismo marco de

lectura. Sin embargo, los elementos no necesitan ser continuos para ser enlazados operativamente.

Promotor: Una región de ADN que se ubica generalmente corriente arriba (hacia una región 5' de un gen) que se necesita para transcripción, Los promotores pueden permitir la activación adecuada o represión del gen que controlan. Un promotor puede contener secuencias específicas que se reconocen por los factores de transcripción. Estos factores se pueden unir a las secuencias de ADN del promotor y resultan en el reclutamiento de la ARN polimerasa, una enzima que sintetiza el ARN de la región de codificación del gen.

Transformada: Una célula es "transformada" por una molécula de ácido nucleico transducida en la célula cuando la molécula de ácido nucleico se vuelve establemente replicada por la célula, ya sea por incorporación de la molécula de ácido nucleico en el genoma celular o por replicación episomal. Como se usa en la presente descripción, el término "transformación" abarca todas las técnicas mediante las cuales se puede introducir una molécula de ácido nucleico en dicha célula. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: transfección con vectores virales; transformación con vectores plasmídicos; electroporación (Fromm *et al.* (1986) *Nature* 319:791-3); lipofección (Felgner *et al.* (1987) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84:7413-7); microinyección (Mueller *et al.*, (1978) *Cell* 15:579-85); transferencia mediada por *Agrobacterium* (Fraley *et al.*, (1983) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80:4803-7); captación directa de ADN; transformación mediada por filamentos y el bombardeo con microproyectiles (Klein *et al.* (1987) *Nature* 327:70).

Transgén: Una secuencia de ácido nucleico exógena. En un ejemplo, un transgén es una secuencia génica (por ejemplo, un gen de resistencia a herbicida), un gen que codifica un compuesto industrial o farmacéuticamente útil o un gen que codifica un rasgo agrícola deseable. En aún otro ejemplo, el transgén es una secuencia de ácido nucleico antisentido, en la cual la expresión de la secuencia de ácido nucleico antisentido inhibe la expresión de una secuencia de ácido nucleico diana. Un transgén puede contener secuencias reguladoras enlazadas operativamente al transgén (por ejemplo, un promotor). En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de interés es un transgén. Sin embargo, en otras modalidades, una secuencia polinucleotídica de interés es una secuencia endógena de ácido nucleico, en la cual se desean copias genómicas adicionales de la secuencia de ácidos nucleicos endógenos o una secuencia polinucleotídica que está en orientación antisentido con respecto a la secuencia de una molécula de nucleico diana en el órgano huésped.

Evento transgénico: Un "evento" transgénico se produce mediante la transformación de células de plantas con ADN heterólogo, es decir, un constructo de ácido nucleico que incluye un transgén de interés, la regeneración de una población de plantas resultante de la inserción del transgén en el genoma de la planta y selección de una planta particular caracterizada por la inserción en un lugar particular del genoma. El término "evento" se refiere al transformante original y a la progenie del transformante que incluye el ADN heterólogo. El término "evento" también se refiere a la progenie producida por un cruzamiento sexual

entre el transformante y otra variedad que incluye el ADN genómico/transgén. Incluso después de repetir el retrocruzamiento, el ADN transgénico insertado y el ADN genómico flanqueante (ADN genómico/transgénico) del padre transformado está presente en la
5 progenie del cruce en la misma localización cromosómica. El término "evento" también se refiere al ADN del transformante original y a su progenie que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado que se esperaría que se transfiriera a una progenie que recibe el ADN
10 insertado que incluye el transgén de interés como el resultado de un cruce sexual de una línea parental que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie resultante de autofecundación) y una línea parental que no contiene el ADN insertado.

15 Vector: Una molécula de ácido nucleico introducida en una célula, produciendo de esta manera una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permitan replicarse en la célula huésped, tal como un origen de replicación. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un plásmido, cósmido, bacteriófago o
20 virus que lleva ADN exógeno dentro de una célula. Un vector puede incluir también uno o más genes, moléculas antisentido, y/o genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar o infectar una célula, haciendo que la célula exprese las moléculas de ácido nucleico
25 y/o proteínas codificadas por el vector. Un vector puede incluir

opcionalmente materiales para ayudar a conseguir la entrada de la molécula de ácido nucleico en la célula (por ejemplo, un liposoma, codificación de proteínas, etc.).

A menos que se explique otra cosa específicamente, todos los
5 términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entienden los expertos en la técnica a los que pertenece esta descripción. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar, por ejemplo, en: Lewin, *Genes V*, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (Eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-021 82-9); y Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).
10

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

IV Promotor bidireccional sintético, RUBi3 y ácidos nucleicos que comprenden el mismo

Esta descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que
20 comprenden una secuencia nucleotídica sintética que puede funcionar como un promotor bidireccional. En algunas modalidades, un promotor bidireccional sintético puede estar enlazado operativamente a una o dos secuencias polinucleotídicas de interés. Por ejemplo, el promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz puede estar enlazado
25 operativamente a una o dos secuencias polinucleotídicas de interés

que codifican un gen, (por ejemplo, dos genes, uno en cada extremo del promotor), con el fin de regular la transcripción de al menos una (por ejemplo, una o ambas) secuencia o secuencias nucleotídicas de interés. En algunas modalidades, mediante la incorporación de un URS
5 de un promotor de ubiquitina-3 de arroz en el promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz, se pueden utilizar patrones de expresión y regulación particulares (por ejemplo, tales como los que se muestran por los genes bajo el control del promotor de ubiquitina 3 de arroz) y se pueden obtener con respecto a una secuencia
10 polinucleotídica de interés que está operativamente unida al promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz.

Algunas modalidades de la invención se ejemplifican en la presente invención mediante la incorporación de un elemento promotor de núcleo mínimo de un promotor del gen de ubiquitina-1 de maíz
15 unidireccional (ZmUbi1) en un contexto molecular diferente del promotor nativo para diseñar un promotor bidireccional sintético. Este elemento promotor de núcleo mínimo se denomina en la presente descripción como "minUbi1P" y tiene aproximadamente 200 nt de longitud. La secuenciación y el análisis de los elementos minUbi1P de
20 múltiples especies *Zea* y de los genotipos *Z. mays* ha revelado que los elementos minUbi1P funcionales están altamente conservados, para que un elemento minUbi1P pueda conservar su función como iniciador de la transcripción si la comparten, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, al
25 menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91 %, al

menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% y/o al
5 menos aproximadamente 100% de identidad de secuencia con el elemento minUbi1P de la SEC ID NO: 2. Las características de los elementos minUbi1P que pueden ser útiles en algunas modalidades de la invención pueden incluir, por ejemplo, y sin limitación, la conservación alta mencionada de la secuencia nucleotídica, la
10 presencia de al menos una caja TATA y/o la presencia de al menos un(os) (por ejemplo, dos) elemento(s) de consenso de choque térmico. En particular, los elementos minUbi1P, más de un elemento de consenso de choque térmico pueden estar solapados dentro de la secuencia de minUbi1P.

15 En las modalidades, el proceso de incorporar un elemento minUbi1P en un contexto molecular diferente al de un promotor nativo (es decir, ubiquitina-3 de arroz) para diseñar un promotor bidireccional sintético puede comprender la incorporación del elemento minUbi1P en un promotor de la ubiquitina-3 de arroz mientras se invierte la
20 orientación del elemento minUbi1P con respecto a la secuencia restante del promotor de ubiquitina-3 de arroz. Por consiguiente, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz puede comprender un elemento promotor de núcleo mínimo minUb1P situado en 3' de, y en orientación inversa con respecto a, una secuencia
25 nucleotídica de promotor de ubiquitina-3 de arroz, para que pueda

estar enlazado operativamente a una secuencia nucleotídica de interés situada en 3' de la secuencia nucleotídica del promotor de ubiquitina 3 de arroz. Por ejemplo, el elemento minUbi1P se puede incorporar en el extremo 3' de un promotor de ubiquitina-3 de arroz en orientación
 5 inversa.

Un promotor de bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz puede comprender también uno o más elementos de secuencia adicionales además de un elemento minUbi1P y elementos de un promotor nativo de ubiquitina-3 de arroz. En algunas modalidades, un
 10 promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz puede comprender un promotor URS, un exón (por ejemplo, un péptido líder o señal), un intrón, una secuencia espaciadora y/o combinaciones de uno o más de cualquiera de los precedentes. Por ejemplo y sin limitación, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz puede
 15 comprender una secuencia URS de un promotor de Ubiquitina-3 o ZmUbi1 de arroz, un intrón de un gen de ubiquitina-3 o ZmUbi1 de arroz, un exón que codifica un péptido líder de una gen de ubiquitina-3 de arroz o ZmUbi1, un intrón de un gen de ubiquitina-3 de arroz o ZmUbi1 y combinaciones de los mismos.

20 Un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz puede comprender también uno o más elementos de secuencia adicionales además de un elemento minUBi1P y elementos de un promotor nativo de ubiquitina-3 de arroz que incluye el minUbi1p. En algunas modalidades, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de
 25 arroz puede comprender un promotor URS, un exón (por ejemplo, un

péptido líder o señal), un intrón, una secuencia espaciadora y o combinaciones de uno o más de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo y sin limitación, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz puede comprender una secuencia de URS de un
 5 promotor de ubiquitina-1 de *Zea mays*, un intrón de un gen de ADH, un exón que codifica un péptido líder de un gen de ubiquitina de *Zea mays*, un intrón de un gen de ubiquitina de *Zea mays* y combinaciones de los mismos.

En algunas modalidades de un promotor que comprende un
 10 promotor URS, URS se puede seleccionar para conferir propiedades reguladoras particulares al promotor sintético. Los promotores conocidos varían ampliamente en el tipo de control que ejercen sobre genes enlazados operativamente (por ejemplo, respuestas ambientales, señales de desarrollo e información espacial) y un URS incorporado en
 15 un promotor heterólogo mantiene típicamente el tipo de control que exhibe el URS con respecto a su promotor nativo y gen(es) enlazado(s) operativamente. Langridge *et al.* (1989), *supra*. Ejemplos de promotores eucariotas que se han caracterizado y pueden contener un URS comprendido dentro de un promotor sintético bidireccional de
 20 ubiquitina-3 de arroz de acuerdo con algunas modalidades incluyen, por ejemplo y sin limitación, aquellos promotores descritos en las patentes de EE.UU números 6,437,217 (promotor RS8 de maíz); 5,641,876 (promotor de actina de arroz); 6,426,446 (promotor RS324 de maíz); 6,429,362 (promotor PR-1 de maíz); 6,232,526 (promotor A3
 25 de maíz); 6,177,611 (promotores constitutivos del maíz); 6,433,252

(promotor de oleosina L3 de maíz); 6,429,357 (promotor de actina de arroz 2 e intrón de actina de arroz 2); 5,837,848 (promotor específico de raíz); 6,294,714 (promotores inducibles por luz); 6,140,078 (promotores inducibles por sal); 6,252,138 (promotores inducibles por patógenos); 6,175,060 (promotores inducibles por deficiencia de fósforo); 6,388,170 (promotores bidireccionales); 6,635,806 (promotor gamma-coixina); y la solicitud de patente de EE.UU, No. 09/757,089 (promotor de aldolasa de cloroplasto de maíz).

Otros promotores procariotas ejemplares incluyen el promotor de la nopalina sintasa (NOS) (Ebert et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745-9); promotor de octopina sintasa (OCS) (que se lleva a cabo en plásmidos inductores de tumores de *Agrobacterium tumefaciens*); promotores de caulimovirus tales como el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Lawton et al., (1987) Plant Mol. Biol. 9:315-24); promotor CaMV 35S (Odell et al. (1985) Nature 313:810-2); promotor 35S del virus del mosaico de escrofularia (Walker et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (19):6624-8); promotor de sacarosa sintasa (Yang y Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-8); promotor del complejo del gen R (Chandler et al. (1989) Plant Cell 1:1175-83); CaMV35S (Patentes de EE.UU números 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142 y 5,530,196); FMV35S (Patentes de EE.UU. números 6,051,753 y 5,378,619); un promotor PC1SV (Patente de EE.UU. No. 5,850,019); promotor SCP1 (Patente de EE.UU. No. 6,677,503); promotores *Agrobacterium tumefaciens* Nos (Número de acceso de GenBank: V00087, Depicker et al. (1982) J. Mol. Appl.

Genet. 1:561-73, Bevan *et al.* (1983) Nature 304:184-7) y similares.

En algunas modalidades, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz puede comprender además un exón. Por ejemplo, puede ser deseable direccionar o dirigir un polipéptido codificado por una secuencia polinucleotídica de interés enlazada operativamente al promotor a una ubicación y/o compartimento subcelular particular. En estas y otras modalidades, se puede incorporar una secuencia codificadora (exón) en una molécula de ácido nucleico entre la secuencia del promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz y una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido. Estos elementos se pueden disponer de acuerdo con la discreción del experto en la técnica para que el promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz promueva la expresión de un polipéptido (o una o ambas secuencias que codifican el polipéptido que se enlazan operativamente al promotor) que comprende el péptido codificado por la secuencia codificadora incorporada en una relación funcional con el resto del polipéptido. En ejemplos particulares, se puede incorporar un exón que codifica un péptido líder, transitorio o de señal (por ejemplo, un péptido líder Ubi1 de *Zea Mays*).

Los péptidos que pueden ser codificados por un exón incorporado en un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz incluyen, por ejemplo y sin limitación: un péptido líder de ubiquitina (por ejemplo, Ubi1 de *Zea mays*), un péptido de tránsito de cloroplastos (CTP) (por ejemplo, EPSPS CTP de *A. thaliana* (Klee *et al.* (1987) Mol. Gen. Genet. 210: 437-42), y la EPSPS CTP de *Petunia hybrida* (della-Cioppa

et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6873-7)), tal como se ejemplifica para la orientación por cloroplasto de la monooxigenasa dicamba (DMO) en la Publicación Internacional PCT No. WO 2008/105890.

5 Los intrones también se pueden incorporar en un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz en algunas modalidades de la invención, por ejemplo, entre la secuencia del promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 del arroz y una secuencia polinucleotídica de interés que está enlazada operativamente al

10 promotor. En algunos ejemplos, un intrón incorporado en un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz puede ser, sin limitación, una 5' UTR que funciona como una secuencia líder de traducción que está presente en un ARNm completamente procesado corriente arriba de la secuencia de inicio de traducción (tal como una

15 secuencia líder de traducción puede afectar el procesamiento de un transcrito primario a ARNm, estabilidad de ARNm, y/o eficacia de traducción). Ejemplos de secuencias líderes de traducción incluyen líderes de proteína de choque térmico de maíz y petunia (patente de EE.UU. No. 5,362,865), líderes de proteínas de recubrimiento de virus

20 de plantas, líderes de rubisco de las plantas y otros. Ver, por ejemplo, Tumer y Foster (1995) Molecular Biotech. 3(3):225-36. Ejemplos no limitativos de las 5'-UTR incluyen GmHsp (Patente de EE.UU. No. 5,659,122), PhDnaK (Patente de EE.UU. No. 5,362,865), AtAnt1, TEV (Carrington y Freed (1990) J. Virol. 64: 1590-7) y AGRtunos (Número

25 de acceso de GenBank: V00087, y Bevan *et al.*, (1983) Nature 304:184-

7). En ejemplos concretos, un intrón de ubiquitina-1 de *Zea mays* se puede incorporar en un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz.

Las secuencias adicionales que se pueden incorporar
5 opcionalmente en un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz incluyen, por ejemplo y sin limitación: secuencias no traducidas 3', regiones de terminación de la transcripción 3' y regiones de poliadenilación. Estos son elementos genéticos situados corriente abajo de una secuencia polinucleotídica de interés (por ejemplo, una
10 secuencia de interés que está operativamente unida a un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz) e incluyen polinucleótidos que proporcionan señal de poliadenilación y/o señales reguladoras capaces de afectar la transcripción, el procesamiento del ARNm o la expresión génica. Una señal de poliadenilación puede
15 funcionar en plantas para provocar la adición de nucleótidos de poliadenilato en el extremo 3' de un precursor de ARNm. La secuencia de poliadenilación se puede derivar del gen natural, de una variedad de genes de plantas o de genes de ADN-T. Un ejemplo no limitativo de una región de terminación de transcripción 3' es la región de nopalina
20 sintasa 3' (nos 3'; Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7). Un ejemplo del uso de regiones 3' no traducidas diferentes se proporciona en Ingelbrecht et al., (1989) Plant Cell 1:671-80. Ejemplos no limitativos de señales de poliadenilación incluyen uno de un gen de RbcS2 de *Pisum sativum* (Ps.RbcS2-E9, Coruzzi et al. (1984)
25 EMBO J. 3:1671-9) y el gen *Agrobacterium tumefaciens* Nos (Número

de acceso de GenBank: E01312).

En algunas modalidades, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz comprende una o más secuencias nucleotídicas que facilitan el direccionamiento de un ácido nucleico que comprende el promotor a un locus particular en el genoma de un organismo diana. Por ejemplo, se pueden incluir una o más secuencias que son homólogas a los segmentos de secuencia de ADN genómico en el huésped (por ejemplo, secuencias de ADN genómico únicas o raras). En algunos ejemplos, estas secuencias homólogas pueden guiar la recombinación y la integración de un ácido nucleico que comprende un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz en el sitio del ADN homólogo en el genoma del huésped. En los ejemplos particulares, un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz comprende una o más secuencias nucleotídicas que facilitan el direccionamiento de un ácido nucleico que comprende el promotor a una localización rara o única en un genoma huésped que utiliza enzimas de nucleasa modificadas genéticamente que reconocen la secuencia en la ubicación rara o única y facilitan la integración en esa ubicación rara o única. Un tal sistema de integración dirigido que utiliza endonucleasas de dedo de zinc como enzima nucleasa se describe en la solicitud de patente de EE.UU. No. 13/011,735, cuyo contenido se incorpora en la presente descripción como referencia.

En otras modalidades, la descripción incluye además como una modalidad la secuencia polinucleotídica de interés que comprende un rasgo. El rasgo puede ser un rasgo de resistencia a insecticida, rasgo

de tolerancia a herbicida, rasgo de eficiencia de uso de nitrógeno, rasgo de eficiencia de uso de agua, rasgo de calidad nutricional, rasgo de unión al ADN, rasgo de marcador seleccionable y cualquier combinación de los mismos.

5 En modalidades adicionales, los rasgos se integran dentro de la célula de planta transgénica como un evento transgénico. En modalidades adicionales, el evento transgénico produce un producto básico. Por consiguiente, una composición se deriva de células de plantas transgénicas de la presente invención, en donde dicha
10 composición es un producto básico seleccionado del grupo que consiste en alimento, harina, concentrado de proteína o aceite. En modalidades adicionales, se incluyen los productos básicos producidos por plantas transgénicas derivadas de células de plantas transformadas, en donde los productos básicos comprenden una
15 cantidad detectable de una secuencia de ácido nucleico de la invención. En algunas modalidades, tales productos básicos se pueden producir, por ejemplo, mediante la obtención de plantas transgénicas y la preparación de alimentos o forrajes de los mismos. Los productos básicos que comprenden una o más de las secuencias de ácido
20 nucleico de la invención incluyen, por ejemplo y sin limitación: alimentos, aceites, granos triturados o enteros o semillas de una planta y cualquier producto alimenticio que comprende cualquier tipo de alimento, aceite, grano entero de una planta o semilla recombinante que comprende una o más de las secuencias de ácido nucleico de la
25 invención. La detección de una o más de las secuencias de la

invención en uno o más productos básicos es evidencia de facto de que la mercancía o producto básico se produce a partir de una planta transgénica diseñada para expresar uno o más rasgos agronómicos.

Los ácidos nucleicos que comprenden un promotor bidireccional
5 sintético de ubiquitina-3 de arroz se pueden producir usando cualquier técnica conocida, incluyendo, por ejemplo y sin limitación: RCA, amplificación por PCR, amplificación por RT-PCR, OLA y SNUPE. Estas y otras técnicas equivalentes son bien conocidas por los expertos y se describen adicionalmente a detalle, por ejemplo, y sin limitación en:
10 Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001 y Ausubel *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1998. Todas las referencias citadas anteriormente, incluyendo ambos manuales anteriores, se incorporan por referencia en su totalidad, incluyendo
15 cualquiera de los dibujos, figuras y/o tablas proporcionadas en los mismos.

V. Entrega a una célula de una molécula de ácido nucleico que comprende un promotor bidireccional sintético, RUBi3

La presente descripción también proporciona métodos para
20 transformar una célula con una molécula de ácido nucleico que comprende un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz. Cualquiera de las numerosas técnicas conocidas en la técnica para la introducción de moléculas de ácido nucleico en plantas se puede usar para transformar una planta con una molécula de ácido nucleico que
25 comprende un promotor bidireccional de ubiquitina-3 de arroz de

acuerdo con algunas modalidades, por ejemplo, para introducir uno o más promotores bidireccionales sintéticos de ubiquitina-3 de arroz en el genoma de la planta huésped, y/o para introducir adicionalmente uno o más polinucleótidos de interés unidos operativamente al promotor.

- 5 Los métodos adecuados para la transformación de plantas incluyen cualquiera de los siguientes métodos mediante los cuales se puede introducir el ADN en una célula, por ejemplo y sin imitación: electroporación (ver, por ejemplo, patente de EE.UU. No. 5,384,253), bombardeo con microproyectiles (ver, por ejemplo, las patentes de
10 EE.UU. números 5,015,580, 5,550,318, 5,538,880, 6,160,208, 6,399,861 y 6,108,865), transformación mediada por *Agrobacterium* (ver, por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 5,635,055, 5,824,877, 5,591,616, 5,981,840 y 6,384,301) y transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5,508,184).
- 15 Mediante la aplicación de técnicas tales como las anteriores, las células de virtualmente cualquier especie vegetal pueden ser transformadas de forma estable, y estas células se pueden desarrollar en plantas transgénicas mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las técnicas que pueden ser particularmente
20 útiles en el contexto de la transformación del algodón se describen en las patentes de EE.UU. números 5,846,797, 5,159,135, 5,004,863 y 6,624,344; particularmente se describen técnicas para transformar plantas de *Brassica*, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 5,750,871; se describen las técnicas para transformar la soya, por
25 ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 6,384,301; se describen técnicas

para transformar el maíz, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. números 7,060,876 y 5,591,616 y en la Publicación Internacional PCT WO 95/06722.

Después de efectuar la entrega de un ácido nucleico exógeno a
5 una célula receptora, la célula transformada se identifica generalmente para posteriormente cultivar y regenerar la planta. Con el fin de mejorar la capacidad para identificar los transformantes, se puede desear utilizar un gen marcador seleccionable o tamizado con el vector de transformación utilizado para generar el transformante. En este
10 caso, la población celular potencialmente transformada se puede ensayar exponiendo las células a un agente o agentes selectivos o las células pueden ser rastreadas para el rasgo del gen marcador deseado.

Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o células que han sido marcadas positivas en un ensayo de cribado, se
15 pueden cultivar en medios que soporten la regeneración de plantas. En algunas modalidades, cualquier medio de cultivo de tejido de planta adecuado (por ejemplo, medio MS y N6) puede ser modificado incluyendo otras sustancias, tales como reguladores de crecimiento. El tejido se puede mantener en un medio básico con reguladores de
20 crecimiento hasta que se disponga de suficiente tejido para iniciar los esfuerzos de regeneración de la planta, o después de repetidas rondas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea adecuada para la regeneración (por ejemplo, al menos 2 semanas), después se transfieren a los medios propicios para la formación de brotes. Los
25 cultivos se transfieren periódicamente hasta que se ha producido

suficiente formación de brotes. Una vez formados los brotes, se transfieren a medios que conducen a la formación de raíces. Una vez que se han formado suficientes raíces, las plantas pueden ser transferidas al suelo para un mayor crecimiento y madurez.

5 Para confirmar la presencia de la molécula de ácido nucleico deseada que comprende un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz en las plantas regeneradoras, se pueden realizar una variedad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo: ensayos de biología molecular, tales como transferencia Southern y
10 Northern y PCR; ensayos bioquímicos, tales como la detección de la presencia de un producto proteico, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y/o transferencias Western) o por función enzimática; ensayos de partes de plantas, tales como ensayos de hojas o raíces y el análisis del fenotipo de toda la planta regenerada.

15 Los eventos de integración dirigidos pueden ser seleccionados, por ejemplo, mediante amplificación por PCR usando, por ejemplo, cebadores de oligonucleótidos específicos para moléculas de ácido nucleico de interés. Se entiende que la genotipificación por PCR incluye, pero no se limita a, la amplificación por reacción en cadena de
20 la polimerasa (PCR) del ADN genómico derivado de tejido de callo de planta huésped aislado predicho que contiene una molécula de ácido nucleico de interés integrada en el genoma, seguida de clonación estándar y análisis de secuencias de productos de amplificación por PCR. Los métodos de genotipificación por PCR han sido bien descritos
25 (ver, por ejemplo, Rios *et al.* (2002) Plant J. 32:243-53) y se pueden

aplicar a ADN genómico derivado de cualquier especie de planta o tipo de tejido, incluyendo cultivos celulares. Las combinaciones de cebadores de oligonucleótidos que se unen tanto a la secuencia diana como a la secuencia introducida se pueden usar secuencialmente o

5 multiplexarse en reacciones de amplificación por PCR. Se pueden producir cebadores de oligonucleótidos diseñados para hibridarse con el sitio diana, introduciendo secuencias de ácidos nucleicos y/o combinaciones de los dos. Por lo tanto, las estrategias de genotipificación de PCR pueden incluir, por ejemplo y sin limitación:

10 amplificación de secuencias específicas en el genoma de la planta, amplificación de múltiples secuencias específicas en el genoma de la planta, amplificación de secuencias no específicas en el genoma de la planta y combinaciones de cualquiera de las precedentes. Un experto en la técnica puede idear combinaciones adicionales de cebadores y

15 reacciones de amplificación para interrogar el genoma. Por ejemplo, se puede diseñar un conjunto de cebadores de oligonucleótidos sentido y antisentido para hibridarse con la secuencia o secuencias de ácido nucleico específicas a la diana fuera de los límites de la secuencia de ácido nucleico introducida.

20 Los cebadores de oligonucleótidos sentido y antisentido se pueden diseñar para hibridarse específicamente con una molécula de ácido nucleico introducida, por ejemplo, en una secuencia correspondiente a una región codificadora dentro de una secuencia polinucleotídica de interés comprendida en la misma u otras partes de

25 la molécula de ácido nucleico. Estos cebadores se pueden usar

conjuntamente con los cebadores descritos anteriormente. Los cebadores de oligonucleótidos se pueden sintetizar de acuerdo con una secuencia deseada y están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA). La amplificación se puede seguir por clonación y secuenciación o por análisis de secuencia directa de productos de amplificación. Un experto en la técnica podría imaginar métodos alternativos para el análisis de productos de amplificación generados durante la genotipificación por PCR. En una modalidad, se utilizan cebadores de oligonucleótidos específicos para la diana genética en amplificaciones por PCR.

VI. Células, cultivos de células, tejidos y organismos que comprenden el promotor bidireccional sintético, RUBi 3

Algunas modalidades de la presente invención también proporcionan células que comprenden un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz, por ejemplo, como puede estar presente en un constructo de ácido nucleico. En ejemplos particulares, se puede utilizar un promotor bidireccional de ubiquitina-3 sintético de arroz de acuerdo con algunas modalidades como una secuencia reguladora para regular la expresión de transgenes en células de plantas y plantas. En algunos de estos ejemplos, el uso de un promotor bidireccional sintético RUBi3 enlazado operativamente a una secuencia polinucleotídica de interés (por ejemplo, un transgén) puede reducir el número de promotores homólogos necesarios para regular la expresión de un número dado de secuencias polinucleotídicas de interés, y/o reducir el tamaño del (de los) constructo(s) de ácido nucleico requerido

para introducir un número dado de secuencias nucleotídicas de interés. Además, el uso de un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz puede permitir la co-expresión de dos secuencias nucleotídicas enlazadas operativamente de interés bajo las mismas condiciones (es decir, las condiciones bajo las cuales el promotor RUBi3 es activo). Tales ejemplos pueden ser particularmente útiles, por ejemplo, cuando las dos secuencias de polinucleótidos unidas operativamente de interés contribuyen cada una a un solo rasgo en un huésped transgénico que comprende las secuencias nucleotídicas de interés y la co-expresión de las secuencias nucleotídicas de interés impactan ventajosamente la expresión del rasgo en el huésped transgénico.

En algunas modalidades, una planta transgénica que comprende uno o más promotores y/o secuencia(s) bidireccional(es) sintética(s) de la ubiquitina-3 de arroz de interés puede tener uno o más rasgos deseables conferidos (por ejemplo, introducidos, mejorados o contribuidos a) mediante la expresión de la secuencia o secuencias nucleotídicas de interés en la planta. Tales rasgos pueden incluir, por ejemplo y sin limitación: resistencia a insectos, otras plagas y agentes causantes de enfermedades; tolerancia a los herbicidas; mayor estabilidad, rendimiento o vida útil; tolerancias ambientales; producción farmacéutica; producción de productos industriales y mejoras nutricionales. En algunos ejemplos, se puede conferir un rasgo deseable mediante la transformación de una planta con una molécula de ácido nucleico que comprende un promotor bidireccional sintético de

ubiquitina-3 de arroz enlazado operativamente a una secuencia polinucleotídica de interés. En algunos ejemplos, un rasgo deseable se puede conferir a una planta producida como una planta de progenie a través de la reproducción, cuyo rasgo puede ser conferido por una o
5 más secuencias nucleotídicas de interés que se introducen operativamente a un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz que se pasa a la planta a partir de una planta madre que comprende una secuencia nucleotídica de interés enlazada operativamente a un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de
10 arroz.

Una planta transgénica de acuerdo con algunas modalidades puede ser cualquier planta capaz de ser transformada con una molécula de ácido nucleico de la invención, o de ser cultivada con una planta transformada con una molécula de ácido nucleico de la
15 invención. Por consiguiente, la planta puede ser una dicotiledónea o monocotiledónea. Ejemplos no limitativos de plantas dicotiledóneas para uso en algunos ejemplos incluyen: alfalfa, frijoles, brócoli, col, canola, zanahoria, coliflor, apio, col china, algodón, pepino, berenjena, lechuga, melón, guisante, pimienta, cacahuete, papa, calabaza,
20 rábano, colza, espinaca, soya, calabacita, remolacha azucarera, girasol, tabaco, tomate y sandía. Ejemplos no limitativos de plantas monocotiledóneas para uso en algunos ejemplos incluyen: *Brachypodium*, maíz, cebolla, arroz, sorgo, trigo, centeno, mijo, caña de azúcar, avena, triticale, césped de pradera y césped.

25 En algunas modalidades, una planta transgénica se puede usar o

cultivar de cualquier manera, en donde es deseable la presencia de un promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3 de arroz y/o una secuencia polinucleotídica enlazada operativamente de interés. Por consiguiente, tales plantas transgénicas pueden ser modificadas genéticamente para, entre otras cosas, tener uno o más rasgos
 5 deseados o eventos transgénicos, transformándose con moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, y se pueden cultivar por cualquier método conocido por los expertos en la técnica.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas
 10 características y/o modalidades particulares. Los ejemplos no deben ser interpretados para limitar la descripción a las características particulares o modalidades ejemplificadas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Diseño de promotor bidireccional

15 Un promotor bidireccional que contiene elementos reguladores de genes de promotores de ubiquitina-1 de *Zea mays* (ZmUbi1) y ubiquitina-3 de arroz se diseñó y se presenta como SEC ID NO:1. Este promotor bidireccional contiene la secuencia del promotor ZmUbi1 parcial (pares de bases 1-1,313; SEC ID NO:8) fusionada en
 20 orientación complementaria inversa al extremo 5' del promotor Rubi3 de longitud completa (pares de bases-1,314-3,303; SEC ID NO:9). Los componentes del promotor ZmUbi1 parcial contiene una región de 215 bp del promotor de núcleo mínimo ZmUbi1 (subrayada en las pares de bases 1,099-1,313; SEC ID NO:2), la región no traducida 5' de ZmUbi1
 25 (marcada en negrita en las pares de bases 1,016-1,097; SEC ID NO:3)

y el intrón ZmUbi1 (fuente minúscula en pares de bases 1-,015, SEC ID NO:4). Los componentes del promotor de Ubi3 de arroz de longitud completa contiene una región corriente arriba y de promotor de núcleo (fuente de cursiva en las pares de bases 1,314-2,096; SEC ID NO:7),

5 región no traducida 5' de Ubi3 de arroz (negrita y subrayado en las

tgcaagtaacacaaacaacagggtgagcatcgacaaaagaaacagtagcaagcaataatagcgtatgaagggc
 agggctaaaaaatccacatatagctgctgcatatgccatcatcaagtatatcaagatcgaaataattataaaacatactt
 gtttattataatagataggtactcaagggttagagcatatgaatagatgctgcatatgccatcatgtatatgcatcagtaaaac
 ccacatcaacatgtatacctatcctagatcgatatttccatccatcttaaacctgtaactatgaagatgtatgacacacacat
 acagttccaaaattaataaacaccaggtagtttgaacagtagtttactccgatctagaacgaatgaacgaccgccccaa
 10 ccacaccacatcatcacaaccaagcgaacaaaaagcatctctgtatatgcatcagtaaaacccgcatcaacatgtatacc
 tatectagatcgatatttccatccatcatcttcaattcgaactatgaatattgtatggcacacacatacagatccaaaattaata
 aatccaccaggtagtttgaacagaatttactccgatctagaacgaccgccccaccagaccacatcatcacaaccaag
 acaaaaaaaagcatgaaaagatgacccgacaaacaagtgcacggcatatattgaaataaaggaaaagggcaaacca
 accctatgcaacgaaacaaaaaaatcatgaaatcgatcccgctctgcggaacggctagagccatcccaggattcccca
 15 aagagaaacactggcaagtttagcaatcagaacgtgtctgacgtacaggtcgcatccgtgtacgaacgctagcagcag
 gatctaacacaaacacggatctaacacaaacatgaacagaagtagaactaccggggccctaaccatgcatggaccgga
 acgccgatctagagaaggttagagagggggggggggggggaggagcagcggcgctac**CTTGAAGCGGA**
GGTGCCGACGGGTGGATTTGGGGGAGATCTGGTTGTGTGTGTGTG
CGCTCCGAACAACACGAGGTTGGGGAAAGAGGGTGTGGAGGGGGTG
TCTATTTATTACGGCGGGCGAGGAAGGGAAAGCGAAGGAGCGGTGGGA
 20 AAGGAATCCCCCGTAGCTGCCGGTGCCGTGAGAGGAGGAGGAGGCCGC
CTGCCGTGCCGGCTCACGTCTGCCGCTCCGCCACGCAATTTCTGGATGC
CGAGGCCGACGAAGCGCCGGCGAGTACGGCGCCGCGGGCGGCCTCTGCCC
GTGCCCTCTGCGCGTGGGAGGGAGAGGCCGCGGTGGTGGGGGCGCGCGC
GCGCGCGCGCGCAGCTGGTGCGGCGGCGCGGGGGTCAGCCGCCGAGCCG
GCGGCGACGGAGGAGCAGGGCGGCGTGGACGCGAACTTCCGATCGGTTGG
 25 *TCAGAGTGCGCGAGTTGGGCTTAGCCAATTAGGTCTCAACAATCTATTGGGC*
CGTAAATTCATGGGCCCTGGTTTGTCTAGGCCCAATATCCCGTTCAATTCAG
CCCACAAATATTTCCCCAGAGGATTATTAAGGCCACACGCAGCTTATAGCAG
ATCAAGTACGATGTTTCCTGATCGTTGGATCGGAAACGTACGGTCTTGATCAG
GCATGCCGACTTCGTCAAAGAGAGGCGGCATGACCTGACGCGGAGTTGGTT

5 *CCGGGCACCGTCTGGATGGTCGTACCGGGACCGGACACGTGTCGCGCCTC*
CAACTACATGGACACGTGTGGTGCTGCCATTGGGGCCGTACGCGTGGCGGGTG
ACCGCACCGGATGCTGCCTCGCACCGCCTTGCCCACGCTTTATATAGAGAG
*GTTTTCTCTCCATTAATCGC**ATAGCGAGTCGAATCGACCGAAGGGGAG*
*GGGGAGCGAAGCTTTGCGTTCTCTAATCGCCTCGTCAAG**gtaactaatcaat*
cacctcgtcctaatacctcgaatctctcgtggtgcccgtctaatactcgcgattttgatgctcgtggtggaaagcgtaggagg
 10 *atcccgtgcgagttagttcctaatactctcagggtttcgtgcgattttagggtgatccacctcttaatcgagttacggtttcgtgc*
gattttagggtaatcctcttaatactctcattgattttagggtttcgtgagaatcgaggtagggatctgtgttatttatatcgatcta
atagatggattggtttgagattgttctgtcagatggggattgtttcgatatattaccctaataatgatgtgtcagatggggattgtt
tcgatatattaccctaataatgatgtgtcagatggggattgtttcgatatattaccctaataatgatggataataagagtagttcacagt
tatgttttgatcctgccacatagtttgagttttgtgatcagatttagtttcacttattgtgcttagttcggatgggattgttctgat
 15 *attgttccaatagatgaatagctcgttaggttaaaatcttttaggttgagttaggcgacacatagtttatttccctctggatttggg*
ttggaattgtgttcttagttttttcccctggatttggattggaattgtgtggagctgggttagagaattacatctgtatcgtgta
cacctacttgaactgtagagcttgggttctaagggtcaatttaactctgtattgtatctggctctttgcctagtgaactgtagtgc
tgatgtgtactgtgttttttaccctgtttatttgccttactcgtgcaaatcaaatctgtcagatgctagaactagggtggctttatt
ctgtgttcttacatagatctgttgcctgtagttacttatgtcagttttgttattatctgaagatattttgggtgttgcctgttgatgt
ggtgtgagctgtgagcagcgctcttatgattaatgatgctgtccaattgtagtgtaatatgatgtgattgatgtttcatctatt
 20 *ttgagctgacagtaccgatactgtaggatctggtgccaaactattctccagctgctttttttacctatgttaattccaatccttt*
cttgcctcttcag

Ejemplo 2: Constructos de transformación de plantas

Los constructos de transformación de plantas se diseñaron para
 ensayar la expresión del promotor bidireccional en plantas. El
 25 constructo del promotor bidireccional se generó mediante la inserción

de un promotor mínimo de ubiquitina-1 de *Zea mays* que dirige un gen reportero corriente arriba y en orientación complementaria inversa del promotor primario de ubiquitina-3 de arroz que dirige el segundo gen reportero. Dos plásmidos binarios, pDAB113122 (Figura 1; SEC ID NO:22) y pRAB113142 (Figura 2; SEC ID NO:23) se construyeron para 5 contener el promotor bidireccional novedoso de la SEC ID NO:1 que dirige tanto *Cry34Ab1* (Li H, Olson M, Lin G, Hey T, Tan SY, Narva KE (2013) *Bacillus thuringiensis Cry34Ab1/Cry25Ab1 interactions with western corn rootworm midgut membrane binding sites*. PLoS One 8: e53079) como transgenes *Cry 35Ab1* (Li H, Olson M, Lin G, Hey T, Tan SY, Narva KE (2013) *Bacillus thuringiensis Cry34Ab1/Cry25Ab1 interactions with western corn rootworm midgut membrane binding sites*. PLoS One 8: e53079) y se terminó por StPinII 3' UTR de *Solanum tuberosum* (An *et al.*, (1989) *Plant Cell* 1; 15-22) o Per5 3' UTR de *Zea mays* (Patente de EE.UU. No. 6,699,984). Los constructos resultantes 15 contenían un promotor bidireccional único de la SEC ID NO:1 que dirigía dos transgenes diferentes, que estaban enlazados operativamente al extremo 5' y 3' del promotor bidireccional. Los constructos también incluyen un casete de expresión de gen marcador seleccionable que contenía el promotor de la ubiquitina-1 de *Zea mays* (Christensen *et al.*, (1992) *Plant Molecular Biology* 18, 675-689), el gen *aad-1* (patente de EE.UU. No. 7,838,733) y 3' UTR Lipasa de *Zea mays* (Patente de EE.UU. No. 7,179,902).

Ejemplo 3: Transformación del maíz

25 Los constructos descritos anteriormente se usaron para

transformar células de maíz. Los constructos experimentales se transformaron en la transformación mediada por *Agrobacterium* en el maíz de embriones inmaduros aislados de la línea endogámica, *Zea mays* c.v. BI 04. El método utilizado es similar al publicado por Ishida
 5 *et al.*, (1996) *Nature Biotechnol* 14: 745-750 y Frame *et al.*, (2006) *Plant Cell Rep* 25: 1024-1034, pero con varias modificaciones y mejoras para hacer el método favorable a la transformación de alto rendimiento. En este documento se da un ejemplo de un método usado para producir una serie de eventos transgénicos en el maíz.

10 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Los vectores de expresión binarios se transformaron en la cepa DA13192 de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa ternaria deficiente en RecA) (Patente Internacional WO02012016222). Se seleccionaron colonias de bacterias y se aisló el ADN de plásmido binario y se
 15 confirmó mediante digestión con enzimas de restricción.

Iniciación del cultivo de *Agrobacterium*

Los cultivos de *Agrobacterium* se rayaron desde las reservas de glicerol sobre un medio mínimo de AB y se incubaron a 20°C en la oscuridad durante 3 días. Los cultivos de *Agrobacterium* se colocaron
 20 después en una placa de medio YEP y se incubaron a 20°C en la oscuridad durante 1 día.

El día del experimento, se preparó una mezcla de medio de inoculación y acetosiringona en un volumen apropiado al número de constructos en el experimento. El medio de inoculación se pipeteó en
 25 un matraz estéril, desechable, de 250 mL. Se agregó una solución

madre 1 M de acetosiringona en dimetilsulfóxido al 100% al matraz que contenía medio de inoculación en un volumen apropiado para obtener una concentración final de acetosiringona de 200 μ M.

Para cada constructo, se suspendieron 1-2 bucles de *Agrobacterium* de la placa YEP en 15 mL de la mezcla de medio de inoculación/acetosiringona dentro de un tubo de centrifuga desechable estéril de 50 ml y la densidad óptica de la solución a 600 nm (O.D.₆₀₀) se midió en un espectrofotómetro. La suspensión se diluyó a continuación hasta O.D.₆₀₀ 0.25-0.35 utilizando una mezcla de medio de inoculación/acetosiringona adicional. El tubo de suspensión de *Agrobacterium* se colocó después horizontalmente en un agitador de plataforma ajustado a aproximadamente 75 rpm a temperatura ambiente en un intervalo de 1 a 4 horas antes del uso.

Esterilización de espigas y aislamiento del embrión

Las espigas del cultivar B 104 de *Zea mays* fueron cosechadas 10-12 días después de la polinización. Las espigas cosechadas fueron descascarilladas y esterilizadas superficialmente por inmersión en una solución al 20% de lejía comercial (Cloro germicida Ultra CLOROX®, hipoclorito de sodio al 6.15%) y dos gotas de Tween 20, durante 20 minutos, seguidas de tres enjuagues estériles, agua desionizada dentro de una campana de flujo laminar. Los embriones cigóticos inmaduros (1.8-2.2 mm de longitud) se extirparon asépticamente de cada espiga y se distribuyeron en uno o más tubos de microcentrifuga que contenían 2.0 mL de suspensión de *Agrobacterium* en la cual se agregaron 2 μ l de tensioactivo BREAK-THRU® S233 al 10% (Evonik Industries AG,

Essen, Alemania). La transformación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en la publicación de la solicitud de la patente de EE.UU. No. 2013/0157369 A1.

Ejemplo 4: Confirmación Molecular

5 Las plantas de maíz transgénicas putativas se muestrearon en el estadio de hoja V2-3 para la presencia de transgén usando ensayos de PCR cuantitativa de *cry34Ab1* y *aad-1*. El ADN total se extrajo de las muestras de hojas, utilizando el kit de extracción de ADN MAGATTRACT® (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del
10 fabricante.

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

Cebadores/sondas para *Cry34Ab1*:

20 Cebador sentido: TQ.8v6.1.F: GCCATACCCTCCAGTTG (SEC ID NO:10)

Cebador antisentido: TQ.8v6.1.R:

GCCGTTGATGGAGTAGTAGATGG (SEC ID NO:10)

Sonda: TQ.8v6.1.MGB.P:

25 5'-/56-FAM/ CCGAATCCAACGGCTTCA / MGB (SEC ID NO:12)

Cebadores de invertasa:

Cebador sentido: InvertasaF: TGGCGGACGACGACTTGT (SEC ID NO: 13)

Cebador antisentido: InvertasaR: AAAGTTTGGAGGCTGCCGT
5 (SEC ID NO:14)

Sonda de invertasa: 5'-/5HEX/CGAGCAGACCGCCGTGTACTT
/3BHQ_I/-3' (SEQ ID NO:15)

Posteriormente, se llevaron a cabo las reacciones de PCR en un volumen final de reacción de 10 µl que contenía LIGHTCYCLER® 480
10 Sondas Master Mix de 5 µl de Roche (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN); 0.4 µl de cada uno de los cebadores TQ.8v6.1.F, TQ.8v6.1.R, Invertasa F e InvertasaR de las existencias de 10 µM a una concentración final de 400 nM; 0.4 µl de cada uno de los TQ.8v6.1.MGB.P y sondas de Invertasa de las existencias de 5 µM
15 hasta una concentración final de 200 nM, 0.1 µl de polivinilpirrolidona al 10% (PVP) hasta una concentración final de 0.1 %; 2 µl de ADN genómico de 10 ng/µl y 0.5 µl de agua. El ADN se amplificó en un sistema Roche LIGHTCYCLER® 480 en las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95°C durante 10 minutos; 40 ciclos de los 3 pasos siguientes:
20 95°C durante 10 segundos; 58°C durante 35 segundos y 72°C durante 1 segundo y un ciclo final de 4°C durante 10 segundos. Se determinó el número de copias de *Cry34Ab1* mediante la comparación de los valores de la Diana (gen de interés)/Referencia (Gen de Invertasa) para muestras no conocidas (emitidas por LIGHTCYCLER® 480) a valores
25 de Diana/Referencia de números de controles de *Cry34Ab1*. Además, la

contaminación por la integración inadvertida de la estructura del plásmido de vector binario se detectó mediante un ensayo de sonda de hidrólisis específico para el gen de resistencia a espectinomicina (Spec) soportado en la estructura vectorial binaria.

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

Cebador sentido AAD1: TGTTCTGGTTCCCTCTACCAA (SEC ID
10 NO:16)

Cebador antisentido AAD1: CAACATCCATCACCTTGACTGA
(SEC ID NO:17)

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

- 15 La detección del gen spec que está presente en la estructura binaria utilizada para producir las plantas transgénicas con cebadores de las siguientes secuencias:

SPC1a: CTTAGCTGGATAACGCCAC (SEC ID NO:19)

SPC1s: GACCGTAAGGCTTGATGAA (SEC ID NO:20)

- 20 TQSPC (SONDA FAM): CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA (SEC ID NO:21)

- Por último, de 8-12 plantas T₀ que contenían el gen de interés se muestrearon en V6 para Cry34Ab1, Cry35Ab1 y ensayos ELISA de hoja AAD-1. Múltiples punzones de hojas fueron muestreados. Los ensayos
25 ELISA de Cry34Ab1 de hoja (Agdia, Inc., Elkhart, IN), Cry35Ab1 (Acadia

BioScience) y AAD-1 (Agdia, Inc., Elkart, IN) se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ensayos ELISA foliares se expresaron como partes por millón (ppm, o proteína ng por mg de proteína vegetal total). Las concentraciones de proteína total se
 5 determinaron usando un kit de ensayo de proteínas PIERCE 660® nm (Thermo Scientific, Rockford, IL) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Ejemplo 5: Expresión del transgén en el maíz

Los resultados de ELISA de CRY34 indicaron que el promotor
 10 bidireccional Rubi3 (SEC ID NO:1) dirigió la expresión de Cry34Ab1 y Cry35Ab1 en eventos T₀ que se transformaron con los constructos pDAB113122 y pDAB113142. Las figuras 3 y 4 muestran los resultados de los análisis para el promotor bidireccional a partir de los constructos pDA113122 y pDAB113142. Los datos revelan que existe una
 15 producción consistente de proteína Cry34 y Cry35 en plantas de maíz usando el promotor bidireccional RUBi3 de la SEC ID NO:1. Los niveles de expresión de Cry34 (Figura 3, Tabla 1), Cry35 (Figura 4, Tabla 2) y AAD1 (Figura 5, Tabla 3) fueron similares en ambos constructos pDAB113122 y pDAB113142. Los datos muestran que el promotor
 20 bidireccional Rubi3 descrito en esta invención es útil en la elaboración de rasgos transgénicos para la co-expresión de dos transgenes a partir de un solo elemento promotor bidireccional.

Tabla 1: Expresión media de proteína Cry34 de los constructos pDAB113122 y pDAB113142.

25

Constructo	Expresión media de Cry34 (ng/mg)
pDAB113122	112.38
pDAB113142	42.87647

5 Tabla 2: Expresión media de proteína Cry35 de los constructos pDAB113122 y pDAB113142.

10

Constructo	Expresión media de Cry35 (ng/mg)
pDAB113122	168.8
pDAB113142	187.4

 Tabla 3: Expresión media de proteína Cry35 de constructos pDAB113122 y pDAB113142.

15

Constructo	Expresión media de AAD1 (ng/mg)
pDAB113122	339.0
pDAB113142	353.4

En resumen, se diseñó y caracterizó un nuevo promotor
 20 bidireccional RUBi3 de la SEC ID NO:1. Por primera vez se describe un
 nuevo promotor bidireccional RUBi3 de la SEC ID NO: elemento
 regulador para su uso en construcciones de expresión génica. Los
 promotores de ubiquitina-3 de arroz y ubiquitina-1 de *Zea mays* 1 se
 han convertido en un nuevo promotor bidireccional sintético de
 25 ubiquitina 3 de arroz. El promotor bidireccional sintético de ubiquitina-3

de arroz novedoso comprende una pluralidad de elementos promotores de un promotor de ubiquitina-1 de *Zea mays* y un promotor de ubiquitina-3 de arroz que son funcionales tanto en dicotiledóneas (por ejemplo, soya) como monocotiledóneas (por ejemplo, maíz). Los
5 niveles de expresión del primer y segundo nucleótidos de interés obtenidos a partir del promotor bidireccional parecen ser comparables con los constructos de un gen promotor unidireccional. Los promotores bidireccionales impulsan enérgicamente la expresión de múltiples secuencias transgénicas que se fusionan en cualquiera de los extremos
10 del promotor bidireccional.

Aunque se ha discutido anteriormente un número de aspectos y modalidades ejemplares, los expertos en la técnica reconocerán ciertas modificaciones, permutaciones, adiciones y sub-combinaciones de los mismos. Por lo tanto, se pretende que las siguientes reivindicaciones
15 adjuntas y las reivindicaciones que se presentan a continuación se interpreten incluyendo todas las modificaciones, permutaciones, adiciones y sub-combinaciones que estén dentro de su verdadero espíritu y alcance.