

PROMOTOR DE PLANTAS PARA LA EXPRESIÓN TRANSGÉNICA

Referencia cruzada a una solicitud relacionada

La presente solicitud reivindica prioridad del beneficio de la
5 Solicitud Provisional de la patente de EE.UU. con número de serie
62/147,868 presentada el 15 de abril de 2015, cuya descripción se
incorpora de este modo como referencia en su totalidad.

Incorporación como referencia de material presentado 10 electrónicamente

Se incorpora como referencia en su totalidad un listado de
secuencias de nucleótidos/aminoácidos que puede leerse por
computadora presentado al mismo tiempo que ésta e identificado como
sigue: Un archivo de 36,7 KB ACII (Texto) denominado “77035-WO-PCT-
15 20160322-Sequence-Listing-ST25.txt” creado el 22 de marzo de 2016.

Campo de la descripción

La presente descripción se refiere en términos generales a
composiciones y métodos para promover la transcripción de una
20 secuencia de nucleótidos en una planta o célula de planta. Algunas
modalidades se refieren a un promotor de un gen similar al de
metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que funciona en las
plantas para promover la transcripción de una secuencia de nucleótidos
unida operativamente. Algunas modalidades particulares se refieren a
25 métodos que incluyen un promotor (por ejemplo, para introducir una

molécula de ácido nucleico en una célula) y a células, cultivos de células, tejidos, organismos, y partes de organismos que comprenden un promotor, como también a productos obtenidos a partir de éstos.

5 **Antecedentes**

Muchas especies de plantas tienen la capacidad de transformarse con transgenes para introducir rasgos o características agronómicamente deseables. Las especies de plantas se desarrollan y/o se modifican para que tengan características deseables particulares. En
10 términos generales, los rasgos deseables incluyen, por ejemplo, la mejora de la calidad del valor nutricional, aumento del rendimiento, el otorgamiento de una resistencia contra plagas o enfermedades, el incremento de la tolerancia a la sequía y al estrés, la mejora de las cualidades hortícolas (por ejemplo, la pigmentación y el crecimiento), la
15 provisión de una tolerancia a los herbicidas, el permitir la producción de compuestos y/o materiales industrialmente útiles a partir de la planta, y/o el permitir la producción de productos farmacéuticos.

Las especies de plantas transgénicas que comprenden múltiples transgenes apilados en un solo locus genómico se producen por medio
20 de tecnologías de transformación de plantas. Las tecnologías de transformación de plantas tienen como resultado la introducción de un transgén en una célula de planta, la recuperación de una planta transgénica fértil que contiene la copia integrada de forma estable del transgén en el genoma de la planta, y la subsiguiente expresión de los
25 transgenes a través de la transcripción y la traducción del genoma de

planta tiene como resultado plantas transgénicas que poseen rasgos y fenotipos deseables. Sin embargo, son deseables los mecanismos que permitan la producción de especies de plantas transgénicas que expresen altamente múltiples transgenes diseñados mediante ingeniería genética como una pila de rasgos.

De manera similar, son deseables los mecanismos que permitan la expresión de un transgén en tejidos u órganos particulares de una planta. Por ejemplo, puede lograrse un incremento de la resistencia de una planta a su infección por agentes patógenos transportados por el suelo mediante la transformación del genoma de la planta con un gen de resistencia a los agentes patógenos de manera tal que la proteína de resistencia a los agentes patógenos se exprese fuertemente dentro de las raíces de la planta. Como alternativa, puede ser deseable expresar un transgén en tejidos de planta que se encuentran en una fase de crecimiento o desarrollo particular tal como, por ejemplo, división o elongación de sus células. Además, puede ser deseable expresar un transgén en los tejidos de hoja y de tallo de una planta para proporcionar tolerancia contra los herbicidas, o resistencia contra los insectos y plagas del suelo anteriores.

Por lo tanto, existe una necesidad de nuevos elementos reguladores de genes que puedan impulsar los niveles deseados de expresión de transgenes en tejidos de planta específicos.

Breve resumen

En modalidades de la presente descripción, la descripción se refiere a un vector de ácido nucleico que comprende un promotor unido operativamente a: una secuencia policonectora; un gen no similar al de metalotioneína; o una combinación de la secuencia policonectora y el gen no similar al de metalotioneína, en donde dicho promotor comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el promotor tiene una longitud de 2,000 pb. En modalidades adicionales, el promotor consiste en una secuencia de polinucleótidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID NO: 1. En otras modalidades, el promotor impulsa la expresión de un polinucleótido que codifica un marcador seleccionable. En modalidades adicionales, el promotor se une operativamente a un transgén. En aspectos de esta modalidad, el transgén codifica un marcador seleccionable o un producto génico que confiere resistencia a los insecticidas, tolerancia a los herbicidas, eficiencia en el uso de nitrógeno, eficiencia en el uso del agua o calidad nutricional. Se proporciona el promotor de la SEQ ID N: 1 para su uso con una secuencia de polinucleótidos 3' no traducida (3'-UTR), la secuencia de polinucleótidos 3' no traducida que comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID NO: 3, en donde la secuencia 3' no traducida se une operativamente a dicho policonector o a dicho transgén. En otras modalidades, se proporciona el promotor de la SEQ ID NO: 1 para su uso con una secuencia de

polinucleótidos 5' no traducida, la secuencia de polinucleótidos 5' no traducida que comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID NO: 4, en donde la secuencia 5' no traducida se une operativamente a dicho policonector o a dicho transgén. En otras modalidades, el promotor de la SEQ ID NO: 1 comprende además una secuencia de intrón. En una modalidad adicional, el promotor de la SEQ ID NO: 1 impulsa la expresión específica de los tejidos subterráneos.

En otra modalidad, la presente descripción proporciona una planta no Brachypodium que comprende una secuencia de polinucleótidos que comprende una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID NO: 1 operativamente ligada a un transgén. De acuerdo con esta modalidad, la planta se selecciona de entre el grupo que consiste en maíz, trigo, arroz, sorgo, avena, centeno, banana, caña de azúcar, frijol de soya, algodón, Arabidopsis, tabaco, girasol y canola. Por lo tanto, la planta no Brachypodium que comprende la secuencia de polinucleótidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID NO: 1 puede ser una planta de *Zea mays* en algunas modalidades. En otras modalidades, el transgén que se une operativamente a la secuencia de polinucleótidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID NO: 1 se inserta en el genoma de una planta. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID NO: 1 es un promotor y dicho promotor se une operativamente a un transgén. En otras modalidades, la

planta no *Brachypodium* comprende una secuencia 3' no traducida que comprende la SEQ ID NO: 3 o una secuencia 3' no traducida que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID NO: 3, en donde la secuencia 3' no traducida se une operativamente a dicho transgén. En una modalidad adicional, la secuencia de polinucleótidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID NO: 1 impulsa la expresión del transgén con expresión específica en los tejidos subterráneos. En otra modalidad adicional, la secuencia de polinucleótidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con la SEQ ID NO: 1 tiene una longitud de 2,000 pb.

En una modalidad, la descripción de la presente proporciona un método para producir una célula de planta transgénica, el método que comprende las etapas de: transformar una célula de planta con un casete de expresión génica que comprende un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unido operativamente a por lo menos una secuencia de polinucleótidos de interés; aislar la célula de planta transformada que comprende el casete de expresión génica; y, producir una célula de planta transgénica que comprende el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unido operativamente a por lo menos una secuencia de polinucleótidos de interés. En otras modalidades, la etapa de transformar una célula de planta se lleva a cabo con un método de transformación de planta. El método de transformación de la planta puede seleccionarse del grupo que consiste en un método de

transformación mediado por *Agrobacterium*, un método de transformación biolística, un método de transformación por carburo de silicio, un método de transformación de protoplasto, y un método de transformación de liposomas. En otras modalidades, la secuencia de polinucleótidos de interés se expresa constitutivamente en toda la célula de planta transgénica. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos de interés se integra establemente en el genoma de la célula de planta transgénica. Por lo tanto, el método para producir una célula de planta transgénica puede además comprender las etapas de:

5 regenerar la célula de planta transgénica en una planta transgénica; y, obtener la planta transgénica, en donde la planta transgénica comprende el casete de expresión génica que comprende el promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unido operativamente a por lo menos una secuencia de polinucleótidos de

10 interés. En una modalidad, la célula de planta transgénica es una célula de planta transgénica monocotiledónea o una célula de planta transgénica dicotiledónea. Por ejemplo, la célula de planta transgénica dicotiledónea puede seleccionarse del grupo que consiste en una célula de planta de *Arabidopsis*, una célula de planta de tabaco, una célula de

15 planta de frijol de soya, una célula de planta de canola, y una célula de planta de algodón. Además, la célula de planta transgénica monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una célula de planta de maíz, una célula de planta de arroz, y una célula de planta de trigo. El promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de

20 *Brachypodium distachyon* usado en el método puede comprender el

25

polinucleótido de la SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* puede además comprender una primera secuencia de polinucleótidos de interés unido operativamente al extremo 3' de la SEQ ID NO: 1.

5 En una modalidad, la descripción de la presente proporciona un método para expresar una secuencia de polinucleótidos de interés en una célula de planta, el método que comprende introducir en la célula de planta una secuencia de polinucleótidos de interés unida operativamente a un promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de
10 *Brachypodium distachyon*. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos de interés unida operativamente al promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* se introduce en la célula de planta mediante un método de transformación de plantas. Como tal, el método de transformación de plantas puede
15 seleccionarse del grupo que consiste en un método de transformación mediado por *Agrobacterium*, un método de transformación biolística, un método de transformación por carburo de silicio, un método de transformación de protoplasto y un método de transformación de liposoma. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos de
20 interés se expresa constitutivamente en toda la célula de planta. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos de interés se integra establemente en el genoma de la célula de planta. Como tal, la célula de planta transgénica es una célula de planta monocotiledónea o una célula de planta dicotiledónea. Como un ejemplo, la célula de planta
25 dicotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una célula de

planta de *Arabidopsis*, una célula de planta de tabaco, y una célula de planta de frijol de soya, una célula de planta de canola, y una célula de planta de algodón. Además, la célula de planta monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en una célula de planta de maíz, una
5 célula de planta de arroz y una célula de planta de trigo.

En una modalidad, la descripción de la presente proporciona una célula de planta transgénica que comprende un promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*. En algunas modalidades, la célula de planta transgénica comprende un evento
10 transgénico. En un aspecto de la modalidad, el evento transgénico comprende un rasgo agronómico. Por lo tanto, el rasgo agronómico se selecciona del grupo que consiste en un rasgo de resistencia a los insecticidas, un rasgo de tolerancia a los herbicidas, un rasgo de eficiencia en el uso de nitrógeno, un rasgo de eficiencia en el uso del
15 agua, un rasgo de calidad nutricional, un rasgo de unión del ADN, un rasgo de marcador seleccionable, un rasgo de ARN pequeño, o cualquiera de sus combinaciones. En otras modalidades, el rasgo agronómico comprende un rasgo de tolerancia a los herbicidas. En un aspecto de la modalidad, el rasgo de tolerancia a los herbicidas
20 comprende una secuencia codificante *aad-1*. En algunas modalidades, la célula de planta transgénica produce un producto de consumo. El producto de consumo se selecciona de concentrado de proteínas, aislado de proteínas, grano, harina, material molido, aceite, o fibra. En una modalidad, la célula de planta transgénica se selecciona del grupo
25 que consiste en una célula de planta dicotiledónea o una célula de

planta monocotiledónea. Por lo tanto, la célula de planta monocotiledónea es una célula de planta de maíz. En otras modalidades, el promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* comprende un polinucleótido con una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con el polinucleótido de la SEQ ID NO: 1. Aún en otra modalidad, el promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* tiene una longitud de 2,000 pb. Y en modalidades adicionales, el promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* consiste en la SEQ ID NO: 1. En modalidades adicionales, el promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* consiste en la SEQ ID NO: 1 que se une operativamente al extremo 3' de la SEQ ID NO: 1. En otras modalidades el promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* impulsa la expresión de un rasgo agronómico en los tejidos subterráneos de las plantas.

La presente descripción proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos con una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con el polinucleótido de la SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el polinucleótido aislado impulsa la expresión específica en los tejidos subterráneos. En otras modalidades, el polinucleótido aislado tiene una actividad de expresión dentro de una célula de planta. En modalidades, el polinucleótido aislado comprende un polinucleótido de marco de lectura abierto que codifica un polipéptido; y una secuencia de terminación. Modalidades adicionales incluyen el polinucleótido aislado que comprende una secuencia de

ácidos nucleicos con una identidad de secuencia de por lo menos el 90% con el polinucleótido de la SEQ ID NO: 1, en donde el polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 tiene una longitud de 2,000 pb.

Las características precedentes y otras serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias modalidades, que
5 procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Esta figura es una representación esquemática de pDAB102419 que contiene el promotor del gen similar al de
10 metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 1 (etiquetado como Promotor MTL B distachyon) y la 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 3 (etiquetado como 3'UTR MTL B distachyon).

Figura 2: Esta figura proporciona una alineación de polinucleótidos del promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 1 (2,000 pb) y de los promotores truncados similares al gen de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 7 (1,730 pb), SEQ ID NO: 8 (1,530 pb), SEQ ID NO: 9
15 (1,330 pb), SEQ ID NO: 10 (1,130 pb) y SEQ ID NO: 11 (1,001 pb).

Figura 3: Esta figura proporciona una alineación de polinucleótidos del promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 1 y del promotor modificado de gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID
20 NO: 12.

Figura 4: Esta figura proporciona una alineación de polinucleótidos de la 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium* de la SEQ ID NO: 3 y de la 3'-UTR truncado del gen similar al de metalotioneína de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 13 (264 pb), SEQ ID NO: 14 (332 pb), SEQ ID NO: 15 (630 pb) y SEQ ID NO: 16 (727 pb).

Figura 5: Esta figura proporciona una alineación de polinucleótidos de la 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 3 y de la 3'-UTR modificada del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 17 y la SEQ ID NO: 18.

Descripción detallada

I. Revisión general de diversas modalidades

El desarrollo de productos de plantas transgénicas es de una complejidad creciente. En la actualidad, las plantas transgénicas comercialmente viables requieren el apilamiento de múltiples transgenes en un único locus. Los promotores de planta utilizados para la investigación básica o para aplicaciones biotecnológicas son generalmente unidireccionales, que dirigen solamente un gen que se ha fusionado en su extremo 3' (corriente abajo). Por lo tanto, cada transgén requiere usualmente un promotor para la expresión, en donde se requieren múltiples promotores para expresar múltiples transgenes dentro de una pila de genes. Con un incremento del número de transgenes en las pilas de genes, se usa rutinariamente el mismo

promotor para obtener niveles similares de patrones de expresión para diferentes patógenos. La obtención de niveles similares de expresión de transgenes es necesario para la producción de un rasgo poligénico único. Lamentablemente, se conoce que los constructos multigénicos impulsados por el mismo promotor ocasionan un silenciamiento de genes lo que tiene como resultado productos transgénicos que son menos eficaces en el campo. Los elementos promotores repetidos pueden conducir a un silenciamiento de los genes en base a la homología. Por otra parte, las secuencias repetitivas dentro de un transgén pueden conducir a una recombinación homóloga dentro del locus de los genes, lo que tiene como resultado reordenamientos de los polinucleótidos. El silenciamiento y el reordenamiento de los transgenes tendrá probablemente un efecto indeseable sobre el rendimiento de una planta transgénica producida para expresar transgenes. Además, el exceso de sitios de unión al factor de transcripción (TF) debido a la repetición del promotor puede ocasionar un agotamiento de los TF endógenos lo que conduce a una inactivación transcripcional. Dada la necesidad de introducir múltiples genes en plantas para el diseño metabólico mediante ingeniería genética y el apilamiento de los rasgos, se requieren una variedad de promotores para desarrollar cultivos transgénicos que impulsen la expresión de múltiples genes.

Un problema particular en la identificación de los promotores es la necesidad de identificar promotores específicos de tejidos, etapas del desarrollo y/o funciones en la planta que no se expresan en otros tejidos de la planta. Los promotores específicos de tejidos (es decir, preferidos

de tejidos) o específicos de órganos impulsan la expresión de genes en un determinado tejido tal como en el grano, raíz, hoja o tapetum de la planta. Los promotores específicos de tejidos y de la etapa del desarrollo pueden identificarse inicialmente mediante la observación de la expresión de los genes, que se expresan en tejidos particulares o en períodos de tiempo particulares durante el desarrollo de la planta. Estos promotores específicos de tejidos son requeridos para determinadas aplicaciones en la industria de las plantas transgénicas y son deseables por cuanto permiten la expresión específica de los genes heterólogos de una forma selectiva de tejido y/o de etapa de desarrollo, lo que indica la expresión del gen heterólogo de manera diferencial en diversos órganos, tejidos y/o momentos, pero no en otros tejidos. Por ejemplo, es posible lograr una resistencia incrementada de una planta a la infección por los agentes patógenos transportados por el suelo mediante la transformación del genoma de la planta con un gen de resistencia a los agentes patógenos de manera tal que la proteína de resistencia a los agentes patógenos se exprese fuertemente dentro de las raíces de la planta. Como alternativa, puede ser deseable expresar un transgén en los tejidos de la planta que se encuentran en una fase de crecimiento o de desarrollo en particular tal como, por ejemplo, la división o elongación de las células. Otra aplicación es la deseabilidad de utilizar promotores específicos de tejidos para confinar la expresión de los transgenes que codifican un rasgo agronómico en tipos específicos de tejidos como las células de parénquima en desarrollo. Como tal, un problema particular en la identificación de los promotores es cómo

identificar los promotores, y relacionar el promotor identificado con las propiedades de desarrollo de la célula para la expresión específica en los tejidos.

Otro problema relacionado con la identificación de un promotor es la necesidad de clonar todos los elementos de control transcripcional relevantes cis-actantes y trans-actantes de manera tal que el fragmento de ADN clonado impulse la transcripción en el patrón de expresión específico deseado. Dado que dichos elementos de control se sitúan distalmente con respecto al sitio de iniciación o comienzo de la traducción, el tamaño del polinucleótido que se selecciona para comprender el promotor es de importancia para proporcionar el nivel de expresión y los patrones de expresión de la secuencia de polinucleótidos del promotor. Se conoce que las longitudes de los promotores incluyen información funcional y se ha comprobado que diferentes genes tienen promotores más largos y más cortos que los promotores de otros genes en el genoma. La dilucidación del sitio de comienzo de la transcripción de un promotor y la predicción de los elementos génicos funcionales en la región promotor es un desafío. Elementos adicionales al desafío son la complejidad, la diversidad y la naturaleza degenerativa inherente de los motivos reguladores y de los elementos reguladores cis y trans Blanchette, Mathieu, *et al.* "Genome-wide computational prediction of transcriptional regulatory modules reveals new insights into human gene expression". *Genome research* 16.5 (2006): 656-668). Los elementos reguladores cis y trans se sitúan en las partes distales del promotor que regulan la expresión espacial y

temporal de un gen para que se produzca solamente en los sitios requeridos y en momentos específicos (Porto, Milena Silva, *et al.* "Plant promoters: an approach of structure and function". *Molecular biotechnology* 56.1 (2014): 38-49). Las herramientas existentes para el

5 análisis de los promotores no pueden identificar de manera fiable tales elementos reguladores cis en una secuencia genómica, que predicen, por lo tanto, demasiados falsos positivos porque estas herramientas se enfocan generalmente sólo en el contenido de las secuencias (Fickett JW, Hatzigeorgiou AG (1997) Eukariotic promoter recognition. *Genome*

10 *research* 7: 861–878). Por lo tanto, la identificación de elementos reguladores de los promotores requiere que se obtenga una secuencia adecuada de un tamaño específico que resulte en una expresión impulsora de un transgén unido operativamente de una manera deseable.

15 Se proporcionan métodos y composiciones para superar tales problemas mediante el uso de elementos reguladores del promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* para expresar transgenes en planta.

20 II. Términos y abreviaturas

A lo largo de la solicitud, se usan una serie de términos. A fin de proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y reivindicaciones, que incluye el alcance de tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

25 Como se usa en la presente, el término "intrón" se refiere a

cualquier secuencia de ácidos nucleicos comprendida en un gen (o secuencia de nucleótidos expresada de interés) que se transcribe pero que no se traduce. Los intrones incluyen la secuencia de ácidos nucleicos no traducida dentro de una secuencia expresada de ADN, así como también la secuencia correspondiente en moléculas de ARN transcritas a partir de ella. Un constructo descrito en la presente también puede contener secuencias que potencien la traducción y/o la estabilidad del ARNm tales como intrones. Un ejemplo de uno de tales intrones es el primer intrón del gen II de la variante H3 de histona de *Arabidopsis thaliana* o cualquier otra secuencia de intrón comúnmente conocida. Los intrones pueden usarse en combinación con una secuencia promotora para potenciar la traducción y/o la estabilidad del ARNm.

El término “aislado”, como se usa en la presente significa que se ha eliminado de su ambiente natural, o eliminado de otros compuestos cuando se forma primero el compuesto. El término “aislado” abarca los materiales aislados a partir de fuentes naturales así como también materiales (por ejemplo, ácidos nucleicos y proteínas) recuperados después de la preparación mediante expresión recombinante en una célula huésped, o compuestos sintetizados químicamente tales como moléculas de ácido nucleico, proteínas y péptidos.

El término “purificado”, como se usa en la presente se refiere al aislamiento de una molécula o compuesto en una forma que se encuentra sustancialmente libre de contaminantes normalmente asociados con la molécula o compuesto en un ambiente nativo o natural,

o sustancialmente enriquecido en concentración con respecto a otros compuestos presentes cuando se forma primero el compuesto, y significa que su pureza se ha incrementado como resultado de haberse separado de otros componentes de la composición original. El término

5 “ácido nucleico purificado” se usa en la presente para describir una secuencia de ácidos nucleicos que se ha separado, producido aparte de, o purificado de otros compuestos biológicos que incluyen, sin limitación polipéptidos, lípidos y carbohidratos, mientras se lleva a cabo un cambio químico o funcional en el componente (por ejemplo, un ácido nucleico

10 puede purificarse a partir de un cromosoma mediante la eliminación de proteínas contaminantes y la ruptura de los enlaces químicos que conectan el ácido nucleico al ADN restante en el cromosoma).

El término “sintético”, como se usa en la presente se refiere a una molécula de polinucleótido (es decir, un ADN o ARN) que se ha creado a

15 través de síntesis química como un proceso *in vitro*. Por ejemplo, puede crearse un ADN sintético durante una reacción dentro de un tubo de Eppendorf™, de manera tal que el ADN sintético se produce enzimáticamente a partir de una cadena nativa de ADN o de ARN. Pueden utilizarse otros métodos de laboratorio para sintetizar una

20 secuencia de polinucleótidos. Los oligonucleótidos pueden sintetizarse químicamente en un sintetizador de oligos a través de síntesis en fase sólida que usa fosforamiditos. Los oligonucleótidos sintetizados pueden hibridarse a otro como un complejo, lo que produce de ese modo un polinucleótido “sintético”. En la técnica se conocen otros métodos para

25 sintetizar químicamente un polinucleótido, y pueden implementarse

fácilmente para su uso en la presente descripción.

El término “aproximadamente”, como se usa en la presente significa mayor o menor que el valor o intervalo de valores establecido en 10 por ciento, pero no tiene por objeto designar ningún valor o intervalo de valores a solamente esta definición más amplia. Cada valor o intervalo de valores precedido por el término “aproximadamente” también tiene por objeto abarcar la modalidad del valor absoluto o el intervalo de valores establecido.

Para los fines de la presente descripción, un “gen”, incluye una región de ADN que codifica un producto génico (ver en lo que sigue), así como también todas las regiones de ADN que regulan la producción del producto génico, tanto si tales secuencias reguladoras se encuentran adyacentes o no a secuencias codificantes y/o transcritas. Por lo tanto, un gen incluye, pero no se limita necesariamente a, secuencias promotoras, terminadores, secuencias reguladoras traduccionales tales como sitios de unión a ribosoma y sitios de entrada internos de ribosoma, potenciadores, silenciadores, aisladores, elementos límite, orígenes de replicación, sitios de fijación a matriz y regiones de control de locus.

Como se usan en la presente los términos “nativo” o “natural” definen una condición encontrada en la naturaleza. Una “secuencia de ADN nativa” es una secuencia de ADN presente en la naturaleza que se produjo mediante medios naturales o técnicas de cultivo tradicionales pero no generada mediante ingeniería genética (por ejemplo, mediante el uso de técnicas de biología molecular/ de transformación).

Como se usa en la presente un “transgén” se define como una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto génico, que incluye por ejemplo, sin limitación, un ARNm. En una modalidad el transgén es un ácido nucleico exógeno, donde la secuencia de transgén se ha introducido en una célula huésped mediante ingeniería genética (o la progenie de esta) donde el transgén no se encuentra normalmente. En un ejemplo, un transgén codifica un compuesto industrialmente o farmacéuticamente útil, o un gen que codifica un rasgo agrícola deseable (por ejemplo, un gen resistente a herbicida). Aún en otro ejemplo, un transgén es una secuencia de ácidos nucleicos antisentido, en donde la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos antisentido inhibe la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo. En una modalidad el transgén es un ácido nucleico endógeno, en donde se desean copias genómicas adicionales del ácido nucleico endógeno, o un ácido nucleico que se encuentra en una orientación antisentido con respecto a la secuencia de un ácido nucleico objetivo en un organismo huésped.

Como se usa en la presente el término “transgén no similar al gen de metalotioneína” o “gen no similar al de metalotioneína” se refiere a cualquier transgén que tiene menos del 80% de identidad de secuencia con la secuencia codificante de un gen similar al de metalotioneína de *Brachypodium distachyon* (SEQ ID NO: 6).

Como se define en la presente un “producto génico” es cualquier producto producido por el gen. Por ejemplo el producto génico puede ser el producto transcripcional directo de un gen (por ejemplo, ARNm, ARNt,

ARNr, ARN antisentido, ARN de interferencia, ribozima, ARN estructural o cualquier otro tipo de ARN) o una proteína producida mediante la traducción de un ARNm. Los productos génicos también incluyen los ARN que se han modificados, mediante procesos tales como formación de caperuza, poliadenilación, metilación, y edición, y proteínas modificadas mediante, por ejemplo, metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, miristilación, y glicosilación. La expresión génica puede afectarse por señales externas, por ejemplo, la exposición de una célula, tejido, u organismo a un agente que incrementa o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen también puede regularse en cualquier parte en la vía de ADN a ARN a proteína. La regulación de la expresión génica se produce, por ejemplo, por medio de controles que actúan sobre la transcripción, traducción, transporte y procesamiento de ARN, degradación de moléculas intermedias tales como ARNm, o mediante la activación, inactivación, compartimentación, o degradación de moléculas de proteína específicas después de su preparación, o mediante combinaciones de éstas. La expresión génica puede medirse al nivel de ARN o al nivel de proteína mediante cualquier método conocido en la técnica, lo que incluye, sin limitación, transferencia por membrana de Northern, RT-PCR, transferencia por membrana de Western, o ensayo(s) *in vitro*, *in situ*, o *in vivo* de la actividad de las proteínas.

Como se usa en la presente el término “expresión génica” se refiere al proceso mediante el que la información codificada de una unidad transcripcional del ácido nucleico (que incluye, por ejemplo, ADN

genómico) se convierte en una parte operativa, no operativa o estructural de una célula, que incluye, frecuentemente, la síntesis de una proteína. La expresión génica puede afectarse por señales externas; por ejemplo, exposición de una célula, tejido, u organismo a un agente

5 que incrementa o disminuye la expresión génica. La expresión de un gen también puede regularse en cualquier parte en la vía de 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

10 intermediarias tales como ARNm, o a través de la activación, inactivación, compartimentación, o degradación de moléculas proteicas específicas después que se han preparado, o por combinaciones de éstas. La expresión génica puede medirse en el nivel de ARN o el nivel de proteína mediante cualquier método conocido en la técnica, que

15 incluye, sin limitación, transferencia por membrana de Northern, RT-PCR, transferencia por membrana de Western, o ensayo(s) *in vitro*, *in situ*, o *in vivo* de actividad de la proteína.

Como se usan en la presente, “silenciamiento de genes en base a su homología” (HBGS) es un término que incluye tanto el silenciamiento

20 transcripcional de genes como el silenciamiento postranscripcional de genes. El silenciamiento de un locus objetivo mediante un locus de silenciamiento no vinculado puede tener como resultado la inhibición de la transcripción (silenciamiento transcripcional de genes; TGS) o degradación de ARNm (silenciamiento postranscripcional de genes; PTGS), debido a la producción de ARN bicatenario (ARNbc) que

25

corresponde a secuencias promotoras o transcritas, respectivamente. La participación de distintos componentes celulares en cada proceso sugiere que es probable que el TGS y PTGS inducidos por el ARNbc resulten de la diversificación de un antiguo mecanismo común. Sin embargo, una comparación estricta de TGS y PTGS ha sido difícil de lograr debido a que esta se basa en términos generales en el análisis de distintos loci de silenciamiento. En algunas instancias, un único locus de transgén desencadena tanto TGS como PTGS, debido a la producción de ARNbc correspondiente a secuencias promotoras y transcritas de diferentes genes objetivo. Mourrain *et al.* (2007) *Planta* 225:365-79. Es probable que los ARNsi sean las moléculas reales que desencadenen TGS y PTGS en secuencias homólogas: en este modelo los ARNsi desencadenarían el silenciamiento y la metilación de secuencias homólogas en *cis* y en *trans* por medio de la dispersión de la metilación de secuencias transgénicas en un promotor endógeno.

Como se usa en la presente, la expresión “molécula de ácido nucleico” (o “ácido nucleico” o “polinucleótido”) puede referirse a una forma polimérica de nucleótidos, que pueden incluir tanto cadenas sentido como anti-sentido de ARN, ADNc, ADN genómico, y formas sintéticas y polímeros mixtos de los anteriores. Un nucleótido puede referirse a un ribonucleótido, desoxirribonucleótido, o a una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Como se usa en la presente, una “molécula de ácido nucleico” es sinónimo de “ácido nucleico” y de “polinucleótido”. Una molécula de ácido nucleico tiene usualmente una longitud de por lo menos 10 bases, a menos que se indique otra cosa. El

término puede referirse a una molécula de ARN o de ADN de longitud indeterminada. La expresión incluye formas mono y bicatenarias de ADN. Una molécula de ácido nucleico puede incluir nucleótidos tanto de presentación natural como modificados ligados entre sí mediante
5 enlaces nucleotídicos de origen natural y/o de origen no natural.

Las moléculas de ácido nucleico pueden modificarse químicamente o bioquímicamente, o pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivadas, como comprenderá fácilmente un experto en la técnica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación,
10 sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótidos (por ejemplo, enlaces sin carga: por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamiditas, carbamatos, etcétera; enlaces cargados: por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etcétera; porciones pendientes: por ejemplo, péptidos;
15 intercaladores: por ejemplo, acridina, psoraleno, etcétera; agentes quelantes; alquiladores; y enlaces modificados: por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etcétera). La expresión “molécula de ácido nucleico” también incluye cualquier conformación topológica, que incluye conformaciones monocatenarias, bicatenarias, parcialmente en dúplex,
20 en tríplex, en horquilla, circular, y de candado.

La transcripción tiene lugar de una manera 5' a 3' a lo largo de la cadena de ADN. Esto significa que el ARN se obtiene mediante adición secuencial de ribonucleótido-5'-trifosfatos al terminal 3' de la cadena creciente (con una eliminación requerida del pirofosfato). En una
25 molécula de ácido nucleico ya sea lineal o circular, los elementos

discretos (por ejemplo, secuencias de nucleótidos particulares) pueden referirse como que se encuentran “corriente arriba” o “5'” con respecto a un elemento si se unen o se hubieran unido al mismo ácido nucleico en la dirección 5' de este elemento. De manera similar, los elementos
5 discretos pueden encontrarse “corriente abajo” o “3'” con respecto a un elemento adicional si se unen o se hubieran unido al mismo ácido nucleico en la dirección 3' de este elemento.

Una “posición” de base, como se usa en la presente, se refiere a la ubicación de una base dada o residuo de nucleótido dentro de un ácido
10 nucleico designado. El ácido nucleico designado puede definirse mediante alineación (ver más adelante) con un ácido nucleico de referencia.

“Hibridación” se refiere a la unión de dos cadenas de polinucleótidos a través de enlaces hidrógeno. Los oligonucleótidos y
15 sus análogos hibridan mediante enlace de hidrógeno, que incluye el enlace de hidrógeno de Watson-Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen invertido, entre bases complementarias. En términos generales, las moléculas de ácido nucleico consisten en bases nitrogenadas que son ya sea pirimidinas (citosina (C), uracilo (U), y timina (T)) o purinas
20 (adenina (A) y guanina (G)). Estas bases nitrogenadas forman enlaces de hidrógeno entre una pirimidina y una purina, y la unión de la pirimidina a la purina se refiere al “apareamiento de bases”. Más específicamente, A se unirá mediante enlace de hidrógeno a T o a U, y G se unirá a C. “Complementario” se refiere al apareamiento de bases
25 que se produce entre dos secuencias de ácidos nucleicos distintas o

entre dos regiones distintas de la misma secuencia de ácidos nucleicos.

“Específicamente hibridizable” y “específicamente complementario” son expresiones que indican un grado suficiente de complementariedad de manera tal que se produce una unión estable y específica entre un oligonucleótido y el ADN o ARN objetivo. No es necesario que el oligonucleótido sea 100% complementario con a su secuencia objetivo para que sea específicamente hibridizable. Un oligonucleótido es específicamente hibridizable cuando la unión del oligonucleótido a la molécula de ADN o ARN objetivo interfiere con la función normal del ADN o ARN objetivo, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica de un oligonucleótido a secuencias no objetivo bajo condiciones donde se desea la unión específica, por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas en el caso de los ensayos o sistemas *in vivo*. Tal unión se refiere como hibridación específica.

Las condiciones de hibridación que resultan en grados particulares de rigurosidad variarán en función de la naturaleza del método de hibridación elegido y de la composición y de la longitud de las secuencias de ácidos nucleicos hibridizantes. En términos generales, la temperatura de hibridación y la fortaleza iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o de Mg^{2+}) del amortiguador de hibridación contribuirán a la rigurosidad de la hibridación, si bien los tiempos de lavado también influyen en la rigurosidad. Los cálculos relacionados con las condiciones de hibridación requeridas para lograr grados particulares de rigurosidad se analizan en: Sambrook *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2da ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, cap. 9 y 11.

Como se usa en la presente, “condiciones rigurosas” abarcan condiciones bajo las que la hibridación se producirá sólo si hay menos del 50% de discordancia entre la molécula de hibridación y el ADN
5 objetivo. “Condiciones rigurosas” incluyen, además, niveles particulares de rigurosidad. Por lo tanto, como se usa en la presente, condiciones de “moderada rigurosidad” son aquellas bajo las que las moléculas con más del 50% de discordancia no hibridarán; condiciones de “elevada rigurosidad” son aquellas bajo las que las secuencias con más del 20%
10 de discordancia no hibridarán; y condiciones de “muy elevada rigurosidad” son aquellas bajo las que las secuencias con más del 10% de discordancia no hibridarán.

En modalidades particulares, las condiciones rigurosas pueden incluir la hibridación a 65 °C, seguida por lavados a 65 °C con 0,1 x
15 SSC/0,1% de SDS durante 40 minutos.

Lo que sigue son condiciones de hibridación representativas, no limitantes:

Rigurosidad muy elevada: hibridación en amortiguador 5x SSC a 65 °C durante 16 horas; lavar dos veces en amortiguador 2x SSC a
20 temperatura ambiente durante 15 minutos cada vez; y lavar dos veces en amortiguador 0,5 x SSC a 65 °C durante 20 minutos cada vez.

Rigurosidad elevada: hibridación en amortiguador 5x-6x SSC a 65-70 °C durante 16-20 horas; lavar dos veces en amortiguador 2 x SSC a temperatura ambiente durante 5-20 minutos cada vez; y lavar dos veces
25 en amortiguador 1 x SSC a 55-70 °C durante 30 minutos cada vez.

Rigurosidad moderada: hibridación en amortiguador 6 x SSC a temperatura ambiente a 55 °C durante 16-20 horas; lavar por lo menos dos veces en amortiguador 2x-3x SSC a temperatura ambiente a 55 °C durante 20-30 minutos cada vez.

5 En modalidades particulares, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridizables pueden permanecer unidas bajo condiciones de hibridación de rigurosidad elevada. En estas y modalidades adicionales, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridizables pueden permanecer unidas bajo
10 condiciones de rigurosidad muy elevadas. En estas y modalidades adicionales, las moléculas de ácido nucleico específicamente hibridizables pueden permanecer unidas bajo condiciones de moderada rigurosidad.

 Oligonucleótido: un oligonucleótido es un polímero de ácido
15 nucleico corto. Los oligonucleótidos pueden formarse mediante escisión de segmentos de ácidos nucleicos más largos, o mediante la polimerización de precursores de nucleótidos individuales. Los sintetizadores automatizados permiten la síntesis de oligonucleótidos hasta varios centenares de pares de base. Dado que los
20 oligonucleótidos pueden unirse a una secuencia de nucleótidos complementaria, pueden usarse como sondas para detectar ADN o ARN. Los oligonucleótidos compuestos de ADN (oligodesoxirribonucleótidos) pueden usarse en la PCR, que es una técnica para la amplificación de pequeñas secuencias de ADN. En la PCR, el oligonucleótido se refiere
25 como un “cebador”, que permite que una ADN polimerasa extienda el

oligonucleótido y replique la cadena complementaria.

Como se usan en la presente, las expresiones “identidad de secuencia” o “identidad”, como se usa en la presente en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, puede referirse a los
5 residuos de las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para la correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación especificada.

Como se usa en la presente, la expresión “porcentaje de identidad de secuencia” puede referirse al valor determinado mediante la
10 comparación de dos secuencias alineadas de manera óptima (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos, y secuencias de aminoácidos) a lo largo de una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (*es decir*, interrupciones) en comparación con la secuencia
15 de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. Se calcula el porcentaje mediante la determinación del número de posiciones en las que se produce el nucleótido o residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para rendir el número de posiciones concordantes, mediante
20 la división del número de posiciones concordantes por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y mediante la multiplicación del resultado por 100 para rendir el porcentaje de identidad de secuencia.

Los métodos para alinear secuencias para su comparación se
25 conocen bien en la técnica. Se describen varios 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
 5 *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 pueden encontrarse en, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

La herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST™; Altschul *et al.* (1990)) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) se encuentra disponible de varias fuentes, que incluye el Centro Nacional para Información sobre Biotecnología (Bethesda, MD), y en Internet,
 15 para su uso en conexión con varios programas de análisis de secuencias. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia mediante el uso de este programa puede encontrarse disponible en Internet bajo la sección “ayuda” para el BLAST™. Para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, puede utilizarse la
 20 función “Blast 2 sequences” del programa BLAST™ (Blastn) mediante el uso de parámetros por defecto. Las secuencias de ácidos nucleicos con una similitud aun mayor con las secuencias de referencia mostrarán una creciente identidad porcentual cuando se evalúan mediante este método.

Como se usa en la presente, la expresión “unido operativamente”
 25 se refiere a una primera secuencia de ácidos nucleicos que se une

operativamente a una segunda secuencia de ácidos nucleicos cuando la primera secuencia de ácidos nucleicos se encuentra en una relación funcional con la segunda secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor se une operativamente a una secuencia codificante cuando el
5 promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Cuando se producen de forma recombinante, las secuencias de ácidos nucleicos unidas operativamente son contiguas en términos generales y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los elementos no necesitan ser
10 contiguos para unirse operativamente.

Como se usa en la presente, el término “promotor” se refiere a una región de ADN que en términos generales se sitúa 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
15 activación o represión adecuada de un gen que este controla. Un promotor puede contener secuencias específicas que son reconocidas por factores de transcripción. Estos factores pueden unirse a una secuencia de ADN promotora, lo que tiene como resultado el reclutamiento de la ARN polimerasa, una enzima que sintetiza ARN a
20 partir de la región codificante del gen. En términos generales el promotor se refiere a todos los elementos reguladores génicos situados corriente arriba del gen, que incluye, promotores situados corriente arriba, 5’-UTR, intrones y secuencias líder.

Como se usa en la presente, la expresión “promotor situado
25 corriente arriba” se refiere a una secuencia de polinucleótidos contigua

que es suficiente para dirigir la iniciación de la transcripción. Como se usa en la presente, un promotor situado corriente arriba abarca el sitio de iniciación de la transcripción con varios motivos de secuencia, que incluyen caja TATA, secuencia iniciadora, elementos de reconocimiento de TFIIB y otros motivos promotores (Jennifer, E.F. *et al.*, (2002) *Genes & Dev.*, 16: 2583-2592). El promotor situado corriente arriba proporciona el sitio de acción para la ARN polimerasa II que es una enzima de múltiples subunidades con los factores de transcripción basales o generales tales como TFIIA, B, D, E, F y H. Estos factores se ensamblan en forma de un complejo de preiniciación de la transcripción que cataliza la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN.

La activación del promotor situado corriente arriba se realiza mediante la secuencia adicional de elementos reguladores de secuencia de ADN a los que se unen varias proteínas y posteriormente interactúan con el complejo de iniciación de la transcripción para activar la expresión génica. Estas secuencias de los elementos reguladores génicos interactúan con factores específicos de unión al ADN. Estos motivos de secuencia a veces hacen referencia a los elementos *cis*. Tales elementos *cis*, a los que se unen factores de transcripción específicos de tejidos o específicos de desarrollo, individualmente o en combinación, pueden determinar el patrón de expresión espaciotemporal de un promotor al nivel transcripcional. Estos *elementos cis* varían ampliamente en cuanto al tipo de control que ejercen sobre los genes unidos operativamente. Algunos elementos actúan para incrementar la transcripción de genes operativamente ligados en respuesta a respuestas

ambientales (por ejemplo, temperatura, humedad y herida). Otros elementos *cis* pueden responder a indicios relacionados con el desarrollo (por ejemplo, germinación, maduración de las semillas, y floración) o a información espacial (por ejemplo, especificidad de tejidos). Ver, por ejemplo, Langridge *et al.*, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:3219-23. Estos elementos *cis* se sitúan solo a una distancia variable del punto de comienzo de la transcripción, algunos elementos *cis* (denominados elementos proximales) son adyacentes a una región promotora de núcleo mínimo mientras que otros elementos pueden situarse a varios kilobases corriente arriba o corriente abajo del promotor (potenciadores).

Como se usa en la presente, el término “región 5’ no traducida” o “5’-UTR” se define como el segmento no traducido en el terminal 5’ de los pre-ARNm o de los ARNm maduros. Por ejemplo, en los ARNm maduros, la 5’-UTR aloja típicamente en su extremo 5’ una caperuza de 7-metilguanosina e interviene en muchos procesos tales como corte y empalme, poliadenilación, exportación de ARNm hacia el citoplasma, identificación del extremo 5’ del ARNm por la maquinaria traduccional, y protección de los ARNm contra su degradación.

Como se usa en la presente, la expresión “terminador de la transcripción” se define como el segmento transcrito en el terminal 3’ de los pre-ARNm o de los ARNm maduros. Por ejemplo, los tramos más largos de ADN más allá del sitio de “señal de poliadenilación” se transcriben como un pre-ARNm. Esta secuencia de ADN usualmente

contiene una señal de terminación de la transcripción para el procesamiento apropiado del pre-ARNm en ARNm maduro.

Como se usa en la presente, la expresión “región 3’ no traducida” o “3’-UTR” se define como el segmento no traducido en un terminal 3’ de los pre-ARNm o de los ARNm maduros. Por ejemplo, en los ARNm maduros esta región aloja la cola de poli-(A) y se conoce que tiene muchos roles en la estabilidad del ARNm, la iniciación de la traducción, y la exportación de ARNm. Por otra parte, se considera que el 3’-UTR incluye la señal de poliadenilación y el terminador de la transcripción.

Como se usa en la presente, la expresión “señal de poliadenilación” designa una secuencia de ácidos nucleicos presente en transcritos de ARNm que permite que los transcritos, cuando se encuentran en presencia de una poli-(A) polimerasa, se poliadenilen en el sitio de poliadenilación, por ejemplo, situado de 10 a 30 bases corriente abajo de la señal poli-(A). En la técnica se conocen muchas señales de ilustrativa incluye AAUAAA y variantes de estos, como se describe en Loke J., *et al.*, (2005) *Plant Physiology* 138(3); 1457-1468.

Un “transgén de unión al ADN” es una secuencia codificante de polinucleótidos que codifica una proteína de unión al ADN. La proteína de unión al ADN es posteriormente capaz de unirse a otra molécula. Una proteína de unión puede unirse a, por ejemplo, una molécula de ADN (una proteína de unión al ADN), una molécula de ARN (una proteína de unión a ARN), y/o una molécula de proteína (una proteína de unión a una proteína). En el caso de una proteína de unión a proteína, esta puede unirse a sí misma (para formar homodímeros, homotrímeros,

etcétera) y/o puede unirse a una o más moléculas de una o más proteínas diferentes. Una proteína de unión puede tener más de un tipo de actividad de unión. Por ejemplo, las proteínas de dedos de cinc tienen actividad de unión al ADN, de unión a ARN, y de unión a
5 proteína.

Los ejemplos de proteínas de unión al ADN incluyen; meganucleasas, dedos de cinc, dominios de unión CRISPR y TALE que pueden “diseñarse mediante ingeniería genética” para unirse a una secuencia de nucleótidos predeterminada. Típicamente, las proteínas de
10 unión al ADN diseñadas mediante ingeniería genética (por ejemplo, dedos de cinc, CRISPR o TALE) son proteínas que no tienen origen natural. Los ejemplos no limitantes de métodos para diseñar mediante ingeniería genética, proteínas de unión al ADN son diseño y selección. Una proteína de unión al ADN diseñada es una proteína que no tiene
15 origen natural y 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 de diseños y datos de unión existentes de ZFP, CRISPR, y/o TALE. Ver,
20 por ejemplo, las patentes de los EE.UU. núms. 6,140,081; 6,453,242; y 6,534,261; ver, además, los documentos WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496 y las publicaciones de los EE.UU. núms. 20110301073, 20110239315 y 20119145940.

Una “proteína de unión al ADN con dedos de cinc” (o dominio de
25 unión) es una proteína, o un dominio dentro de una proteína más

grande, que se une al ADN de una manera específica a la secuencia a través de uno o más dedos de cinc, que son regiones de secuencia de aminoácidos dentro del dominio de unión cuya estructura se estabiliza mediante la coordinación de un ión de cinc. La expresión “proteína de 5 dedo de cinc de unión al ADN” se abrevia frecuentemente como proteína de dedo de cinc o ZFP. Los dominios de dedo de cinc de unión pueden “diseñarse mediante ingeniería genética” para unirse a una secuencia de nucleótidos predeterminada. Los ejemplos no limitantes de métodos para diseñar mediante ingeniería genética proteínas de dedo de cinc son 10 diseño y selección. Una proteína de dedos de cinc diseñada es una proteína que no es de origen natural y 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 la información en una base de datos que 15 almacena información de diseños y datos de unión existentes de ZFP. Ver, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. núms. 6,140,081; 6,453.242; 6,534.261 y 6,794,136; ver, además, los documentos WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496.

En otros ejemplos, el dominio de unión al ADN de una o más de las 20 nucleasas comprende un dominio de unión al ADN de efector TAL de origen natural o diseñado mediante ingeniería genética (que no es de origen natural). Ver, por ejemplo, Publicación de patente de los EE.UU. núm. 20110301073, incorporada en la presente en su totalidad como referencia. Se conoce que las bacterias fitopatógenas del género 25 *Xanthomonas* ocasionan muchas enfermedades en importantes plantas

de cultivo. El carácter patógeno de *Xanthomonas* depende de un sistema de secreción conservado de tipo III (T3S) que inyecta más proteínas efectoras diferentes en la célula de la planta. Entre estas proteínas inyectadas se encuentran los efectores similares al activador de la transcripción (TALEN) que imitan los activadores transcripcionales de la planta y que manipulan el transcriptoma de la planta (ver Kai *et al.*, (2007) *Science* 318:648-651). Estas proteínas contienen un dominio de unión al ADN y un dominio de factor de activación transcripcional. Uno de los efectores TAL mejor caracterizados es el AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (ver Bonas *et al.*, (1989) *Mol Gen Genet* 218: 127-136 y la patente WO2010079430). Los efectores TAL contienen un dominio centralizado de repeticiones en tándem, cada repetición que contiene aproximadamente 34 aminoácidos, que son claves para la especificidad de unión al ADN, de estas proteínas. Además, contienen una secuencia de localización nuclear y un dominio de activación transcripcional ácido, (para una revisión ver: Schornack S, *et al.*, (2006) *J Plant Physiol* 163(3): 256-272). Además, se ha encontrado que en los dos genes de la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum*, designados como *brg11* y *hpx17* son homólogos a la familia AvrBs3 de *Xanthomonas* en la cepa biovar GMI1000 de *R. solanacearum* y en la cepa biovar 4 RS1000 (ver Heuer *et al.*, (2007) *Appl and Enviro Micro* 73(13): 4379-4384). Estos genes tienen una identidad del 98,9% con la secuencia de nucleótidos entre sí pero difieren en una delección de 1,575 pb en el dominio de repetición de *hpx17*. Sin embargo, ambos productos génicos tienen una identidad de secuencia menor al 40% con las

proteínas de la familia AvrBs3 de *Xanthomonas*. Ver, por ejemplo, la Publicación de patente de los EE.UU. núm. 20110301073, incorporada en la presente en su totalidad como referencia.

La especificidad de estos efectores TAL depende de las secuencias encontradas en las repeticiones en tándem. La secuencia repetida comprende aproximadamente 102 pb y las repeticiones son homólogas típicamente en el 91-100% entre sí (Bonas *et al.*, *ibid*). El polimorfismo de las repeticiones se sitúa usualmente en las posiciones 12 y 13 y parece haber una correspondencia de uno a uno entre la identidad de los residuos hipervariables en las posiciones 12 y 13 con la identidad de los nucleótidos contiguos en la secuencia objetivo del efector TAL ver Moscou y Bogdanove, (2009) *Science* 326:1501 y Boch *et al.*, (2009) *Science* 326:1509-1512). Experimentalmente, se ha determinado el código natural para un reconocimiento del ADN de estos efectores TAL de manera tal que una secuencia HD en las posiciones 12 y 13 conduce a una unión a citosina (C), NG se une a T, NI a, C, G o T, NN se une a o G, e ING se une a T. Estas repeticiones de unión al ADN se han ensamblado en proteínas con nuevas combinaciones y números de repeticiones, para obtener factores de transcripción artificiales que son capaces de interactuar con nuevas secuencias y de activar la expresión de un gen reportero no endógeno en las células de la planta (Boch *et al.*, *ibid*). Las proteínas TAL diseñadas mediante ingeniería genética se han unido a un semidominio de escisión *FokI* para rendir una fusión nucleasa de dominio de efector TAL (TALEN) que muestra una actividad en un ensayo reportero de levadura (objetivo basado en plásmido).

El sistema de nucleasa CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Regularmente Separadas Entre Sí)/sistema de nucleasa Cas (asociado a CRISPR) es un sistema de nucleasa diseñado recientemente mediante ingeniería genética en base a un sistema bacteriano que
5 puede usarse para el diseño mediante ingeniería genética de genomas. Se basa en parte a la respuesta inmunológica adaptativa de muchas bacterias y Archaea. Cuando un virus o plásmido invade una bacteria, los segmentos del ADN del invasor se convierten en ARN CRISPR (crARN) mediante la respuesta “inmunológica”. Este crARN después se
10 asocia, mediante una región de complementariedad parcial, a otro tipo de ARN denominado tracrARN para guiar la nucleasa Cas9 a una región homóloga al crARN en el ADN objetivo denominado “protoseparador.” Cas9 escinde el ADN para generar extremos romos en la ruptura de la doble cadena (DSB) en sitios especificados por una secuencia guía de
15 20 nucleótidos contenida dentro del transcrito de crARN. Cas9 requiere tanto del crARN como del tracrARN para el reconocimiento y la escisión de ADN específicos de sitio. Este sistema ahora se ha diseñado mediante ingeniería genética de manera que el crARN y el tracrARN pueden combinarse en una molécula (el “ARN de guía único”), y la
20 porción equivalente de crARN del ARN de guía único puede diseñarse mediante ingeniería genética para guiar a la nucleasa Cas9 para apuntar a cualquier secuencia deseada (ver Jinek *et al.*, (2012) Science 337,página 816-821, Jinek *et al.*, (2013), eLife 2:e00471 y David Segal, (2013) eLife 2:e00563). Por lo tanto, el sistema CRISPR/Cas puede
25 diseñarse mediante ingeniería genética para crear un DSB en un

objetivo deseado en un genoma y la reparación del DSB puede afectarse mediante el uso de inhibidores de reparación para ocasionar un incremento en la reparación propensa a errores.

En otros ejemplos, el transgén de unión al ADN es una nucleasa
 5 específica de sitio que comprende una Meganucleasa diseñada mediante ingeniería genética (que no es de origen natural) (también descrita como una endonucleasa de asentamiento). Se conocen las secuencias de reconocimiento de las endonucleasas de asentamiento o meganucleasas tales como I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI,
 10 I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII y I-TevIII. Ver, además, la patente de los EE.UU. núm. 5,420,032; la patente de los EE.UU núm. 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.*,
 15 (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163–180; Argast *et al.*, (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345–353 y el catálogo de New England Biolabs. Además, la especificidad de unión al ADN de las endonucleasas de asentamiento y de las meganucleasas pueden diseñarse mediante ingeniería genética para unirse a sitios objetivo no naturales Ver, por ejemplo, Chevalier *et al.*,
 20 *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 los EE.UU. núm. 20070117128. Los dominios de unión al ADN de las endonucleasas de asentamiento y de las meganucleasas
 25 pueden alterarse en el contexto de la nucleasa como un todo (es decir,

de manera tal que la nucleasa incluya el dominio de escisión afín) o pueden fusionarse a un dominio de escisión heterólogo.

Como se usa en la presente, el término “transformación” abarca todas las técnicas mediante las que una molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula tal. Los ejemplos incluyen, sin limitación: transfección con vectores virales; transformación con vectores plasmídicos; electroporación; lipofección; microinyección (Mueller *et al.* (1978) Cell 15:579-85); transferencia mediada por *Agrobacterium*; incorporación directa de ADN; transformación mediada por WHISKERS™; y bombardeo con microproyectiles. Estas técnicas pueden usarse 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 se integra establemente en el genoma del organismo huésped y cualquier generación posterior. Los organismos huésped que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se refieren como organismos “transgénicos”. La “transformación transitoria” se refiere a la introducción de un fragmento de ácido nucleico en el núcleo, o en un organelo que contiene ADN, de un organismo huésped lo que tiene como resultado la expresión génica sin una herencia genéticamente estable.

Una secuencia exógena de ácido nucleico. En un ejemplo, un transgén es una secuencia génica (por ejemplo, un gen de resistencia a

herbicidas), un gen que codifica un compuesto industrialmente o farmacéuticamente útil, o un gen que codifica un rasgo agrícola deseable. Y en otro ejemplo, el transgén es una secuencia de ácidos nucleicos antisentido, en donde la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos antisentido inhibe la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo. Un transgén puede contener secuencias reguladoras unidas operativamente al transgén (por ejemplo, un promotor). En algunas modalidades, una secuencia de polinucleótidos de interés es un transgén. Sin embargo, en otras modalidades, una secuencia de polinucleótidos de interés es una secuencia de ácido nucleico endógena, en donde se desean copias genómicas adicionales de la secuencia de ácido nucleico endógena, o una secuencia de ácido nucleico que se encuentra en una orientación antisentido con respecto a la secuencia de una molécula de ácido nucleico objetivo en el organismo huésped.

15 Como se usa en la presente, un “evento” transgénico se produce mediante la transformación de las células de planta 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
20 planta particular caracterizada por la inserción en una ubicación 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 mediante un cruce sexual entre el transformante y otra variedad que incluye el
25 ADN genómico/transgénico. Aun después de retrocruzamiento repetido a

un progenitor recurrente, el ADN transgénico insertado y el ADN genómico flanqueante (ADN genómico-transgénico) del progenitor transformado se encuentra en la progenie del cruce en la misma ubicación cromosómica. El término “evento” también se refiere al ADN del transformante original y de la progenie de este que comprende el ADN insertado y la secuencia genómica flanqueante inmediatamente adyacente al ADN insertado del que podría esperarse que se transfiera a una progenie que recibe el ADN insertado que incluye el transgén de interés como resultado de un cruce sexual de una línea progenitora que incluye el ADN insertado (por ejemplo, el transformante original y la progenie que resulta de la autofecundación) y una línea progenitora que no contiene el ADN insertado.

Como se usa en la presente, los términos “reacción en cadena de la polimerasa” o “PCR” define un procedimiento o técnica en la que cantidades mínimas de ácido nucleico, ARN y/o ADN, se amplifican como se describe en la patente de los EE.UU. núm. 4,683,195, emitida el 28 de julio de 1987. En términos generales, es necesario disponer de información sobre las secuencias desde los extremos de la región de interés o más allá, de manera tal que puedan diseñarse cebadores oligonucleótidos; estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a cadenas opuestas del molde que va a amplificarse. Los nucleótidos 5' terminales de los dos cebadores puede coincidir con los extremos del material amplificado. Puede usarse la PCR para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas a partir del ADN genómico total, y el ADNc transcrito a partir de ARN celular

total, secuencias de bacteriófago o plasmídicas, etcétera. Ver en términos generales Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263 (1987); Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989).

Como se usa en la presente, el término “cebador” se refiere a un
5 nucleótido capaz de actuar como un punto de iniciación de síntesis a lo largo de una cadena complementaria cuando las condiciones sean adecuadas para la síntesis de un producto de extensión de cebador. Las condiciones de síntesis incluyen la presencia de cuatro desoxirribonucleótido trifosfatos diferentes y por lo menos un agente de
10 inducción de la polimerización tal como transcriptasa inversa o ADN polimerasa. Estos se encuentran en un amortiguador adecuado, que puede incluir constituyentes que son cofactores o que afectan las condiciones tales como pH y similares a diversas temperaturas adecuadas. Un cebador es, preferentemente, una secuencia bicatenaria,
15 de manera tal que se optimiza la eficiencia de la amplificación, pero pueden usarse secuencias bicatenarias.

Como se usa en la presente, el término “sonda” se refiere a un oligonucleótido que hibrida en una secuencia objetivo. En el procedimiento de ensayo TaqMan[®] o TaqMan[®]-style, la sonda se hibrida
20 a una porción del objetivo situado entre el sitio de hibridación 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
25 aproximadamente cincuenta nucleótidos. En algunas modalidades, una

sonda incluye de aproximadamente ocho nucleótidos a aproximadamente quince nucleótidos. Una sonda puede además incluir una etiqueta detectable, por ejemplo, un fluoróforo (Texas-Red®, isotiocianato de fluoresceína, etcétera). La etiqueta detectable puede fijarse de manera covalente directamente al oligonucleótido sonda, por ejemplo, puede estar situada en el extremo 5' de la sonda o en el extremo 3' de la sonda. Una sonda que incluye un fluoróforo puede también incluir un apagador, por ejemplo, Black Hole Quencher™, Iowa Black™, etcétera.

Como se usa en la presente, los términos “endonucleasas de restricción” y “enzimas de restricción” se refieren a enzimas bacterianas, cada una que cortan ADN bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica. Las enzimas de restricción de tipo 2 reconocen y escinden el ADN en el mismo sitio, e incluyen sin limitación XbaI, BamHI, HindIII, EcoRI, XhoI, Sall, KpnI, Aval, PstI y SmaI.

Como se usa en la presente, el término “vector” se usa de manera intercambiable con los términos “constructo”, “vector de clonación” y “vector de expresión” y significa el vehículo mediante el que una secuencia de ADN o de ARN (por ejemplo, un gen extraño) puede introducirse en una célula huésped, para transformar el huésped y promover la expresión (por ejemplo la transcripción y la traducción) de la secuencia introducida. Un “vector no viral” tiene como objetivo significar cualquier vector que no comprende un virus o retrovirus. En algunas modalidades un “vector” es una secuencia de ADN que comprende por lo menos un origen de replicación de ADN y por lo menos un gen marcador seleccionable. Los ejemplos incluyen, pero sin

limitación, un plásmido, cósmido, bacteriófago, cromosoma bacteriano artificial (BAC), o virus que porta ADN exógeno en una célula. Un vector también puede incluir uno o more 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, lo que ocasiona de este modo que la célula exprese las moléculas de ácido nucleico y/o proteínas codificadas por el vector. El término “plásmido” define una cadena circular de ácido nucleico capaz de la replicación autosómica ya sea en una célula huésped procariota o eucariota. El término incluye el ácido nucleico que puede ser ya sea ADN o ARN y puede ser monocatenario o bicatenario. El plásmido de la definición también puede incluir las secuencias que corresponden a un origen bacteriano de replicación.

Como se usa en la presente, el término “gen marcador seleccionable” tal como se usa en la presente define un gen u otro casete de expresión que codifica una proteína que facilita la identificación de células en las que se inserta el gen marcador seleccionable. Por ejemplo, un “gen marcador seleccionable” abarca genes reporteros así como también genes usados en la transformación de plantas para, por ejemplo, proteger las células de planta de un agente selectivo o proporcionar una resistencia/tolerancia a un agente selectivo. En una modalidad solamente aquellas células o plantas que reciben un marcador seleccionable funcional son capaces de dividirse o de crecer bajo condiciones que tienen un agente selectivo. Los ejemplos de agentes selectivos pueden incluir, por ejemplo, antibióticos, que

incluyen espectinomycin, neomicin, canamicin, paromomicin, gentamicin, e higromicin. Estos marcadores seleccionables incluyen neomicin fosfotransferasa (npt II), que expresa una enzima que confiere resistencia al antibiótico canamicin, y genes para los

5 antibióticos relacionados neomicin, paromomicin, gentamicin, y G418, o el gen para higromicin fosfotransferasa (hpt), que expresa una enzima que confiere resistencia a higromicin. Otros genes marcadores seleccionables pueden incluir genes que codifican resistencia a herbicidas que incluyen bar o pat (resistencia contra glufosinato amonio

10 o fosfinotricin), acetolactato sintasa (ALS, resistencia contra inhibidores tales como sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TP), pirimidinil oxibenzoatos (POB), y sulfonilamino carboniltriaolinonas que impiden la primera etapa en la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada), glifosato, 2,4-D, y resistencia o

15 sensibilidad a los metales. Los ejemplos de “genes reporteros” que pueden usarse como un gen marcador seleccionable incluyen la observación visual de proteínas expresadas de gen reportero tales como las proteínas que codifican β -glucuronidasa (GUS), luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YPF), DsRed,

20 β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), fosfatasa alcalina, y similares. La frase “positivo al marcador” se refiere a plantas que se han transformado para incluir un gen marcador seleccionable.

Como se usa en la presente, el término “marcador detectable” se refiere a una etiqueta capaz de ser detectada, tal como, por ejemplo, un

25 radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente,

compuesto quimioluminiscente, agente quelante de metales, o enzima. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, sin limitación, los siguientes: etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscente, grupos biotínico, epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un reportero secundario (por ejemplo, secuencias de pares de zipper de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos). En una modalidad, puede fijarse un marcador detectable mediante brazos separadores de diversas longitudes para reducir el potencial impedimento estérico.

Como se usan en la presente, las expresiones “casete”, “casete de expresión” y “casete de expresión génica” se refieren a un segmento de ADN que puede insertarse en un ácido nucleico o polinucleótido en sitios de restricción específicos o mediante recombinación homóloga. Como se usa en la presente el segmento de ADN comprende un polinucleótido que codifica 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 adecuado para la transcripción y traducción. En una modalidad, un casete de expresión puede incluir un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés y que tiene elementos además del polinucleótido que facilitan la transformación de una célula huésped particular. En una modalidad, un casete de expresión génica también puede incluir elementos que permiten la potenciación de la expresión de

un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés en una célula huésped. Estos elementos pueden incluir, sin limitación: un promotor, un promotor mínimo, un potenciador, un elemento de respuesta, una secuencia terminadora, una secuencia de poliadenilación, y similares.

5 Como se usa en la presente un “conector” o “espaciador” es un enlace, molécula o grupo de moléculas que une dos entidades separadas entre sí. Los conectores y espaciadores pueden proporcionar un espaciado óptimo entre las dos entidades o pueden además suministrar un enlace lábil que permite que las dos entidades se
10 separen entre sí. Los enlaces lábiles incluyen grupos fotoescindibles, porciones lábiles a los ácidos, porciones lábiles a las bases y grupos escindibles por enzimas. Los términos “policonector” o “sitio de clonación múltiple” como se usa en la presente definen un aglomerado de tres o más sitios de enzimas de restricción de tipo 2 situados dentro
15 de 10 nucleótidos recíprocos unos a otros en una secuencia de ácidos nucleicos. Los constructos que comprenden un policonector se usan para la inserción y/o escisión de secuencias de ácidos nucleicos tales como la región codificante de un gen. En otros casos el término “policonector”, como se usa en la presente, se refiere a un tramo de
20 nucleótidos que se dirigen para la unión de dos secuencias a través de cualquier método de clonación perfecto conocido (es decir, Gibson Assembly®, NEBuilder HiFiDNA Assembly®, Golden Gate Assembly®, BioBrick® Assembly, etcétera). Los constructos que comprenden un policonector se usan para la inserción y/o escisión de secuencias de
25 ácido nucleico tales como la región codificante de un gen.

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

Como se usa en la presente, el término “planta” incluye una planta entera y cualquier descendiente, célula, tejido o parte de una planta. Una clase de planta que puede usarse en la presente invención es en términos generales tan amplia como la clase de plantas superiores e inferiores aptas para mutagénesis que incluyen angiospermas (plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas), gimnospermas, helechos y algas multicelulares. Por lo tanto, “planta” incluye plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. El término “partes de planta” incluye alguna(s) parte(s) de una planta, que incluye, por ejemplo y sin limitación: semilla (que incluye semilla madura y semilla inmadura); un corte de planta; una célula de planta; un cultivo celular de planta; un órgano de planta (por ejemplo, polen, embriones, flores, frutos, brotes, hojas, tallos y explantes). Un tejido de planta u órgano de planta puede ser una semilla, protoplasto, callo, o cualquier otro grupo de células de planta que se organiza en una unidad estructural o funcional. Un cultivo celular de planta o de tejido puede ser capaz de regenerar una planta que tiene

las características fisiológicas y morfológicas de la planta a partir de la que se obtuvo la célula o tejido, y de regenerar una planta que tiene sustancialmente el mismo genotipo que la planta. En cambio, algunas células de planta no son capaces de regenerarse para producir plantas.

- 5 Las células regenerables en un cultivo celular de planta o de tejido pueden ser embriones, protoplastos, células meristemáticas, callos, polen, hojas, anteras, raíces, puntas de raíces, estigmas, flores, granos, mazorcas, cáscara, o pedúnculos.

Las partes de la planta incluyen partes cosechables y partes útiles
10 para la propagación de plantas progenie. Las partes de plantas útiles incluyen, por ejemplo y sin limitación: semilla; fruto, un esqueje; una plántula, un tubérculo; y un rizoma. Una parte cosechable de una planta puede ser cualquier parte útil de una planta, que incluye, por ejemplo y sin limitación: flor; polen; plántula; tubérculo; hoja; tallo; fruto; semilla; y
15 raíz.

Una célula vegetal es la unidad estructural y fisiológica de la planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. Una célula de planta puede encontrarse en forma de una célula única aislada, o de un agregado de células (por ejemplo, un callo friable y una célula
20 cultivada), y puede ser parte de una unidad organizada superior (por ejemplo, un tejido de planta, órgano de planta, y planta). Por lo tanto, una célula de planta puede ser un protoplasto, una célula que produce gametos, o una célula o colección de células que pueden regenerarse en una planta entera. Como tal, en modalidades de la presente, una
25 semilla, que comprende múltiples células de planta y es capaz de

regenerarse en forma de una planta entera, se considera una “célula vegetal”.

Como se usa en la presente, el término “ARN pequeño” se refiere a diversas clases de ácido ribonucleico no codificante (ncARN). El término

5 ARN pequeño describe las cadenas cortas de ncARN producidas en células bacterianas, animales, plantas y hongos. Estas cadenas cortas de ncARN pueden producirse de manera natural dentro de la célula o pueden producirse mediante la introducción de una secuencia exógena que expresa la cadena corta o ncARN. Las secuencias de ARN cortas no

10 codifican directamente una proteína, y difieren con respecto a su función de otro ARN en que las secuencias de ARN pequeñas solamente se transcriben y no se traducen. Las secuencias de ARN pequeñas intervienen en otras funciones celulares, que incluyen la expresión y modificación de los genes. Las moléculas de ARN pequeñas usualmente

15 consisten en aproximadamente 20 a 30 nucleótidos. Las secuencias de ARN pequeñas pueden derivarse de precursores más largos. Los precursores forman estructuras que se repliegan entre sí en regiones autocomplementarias; después se procesan por la nucleasa Dicer en los animales o DCL1 en las plantas.

20 Existen muchos tipos de ARN pequeño ya sea de forma natural o producidos artificialmente, que incluye los microARN (miARN), los ARN de interferencia cortos (siARN), ARN antisentido, ARN de horquilla corto (shARN) y los ARN nucleolares pequeños (snoARN). Determinados tipos de ARN pequeño, tales como microARN y siARN, son importantes en el

25 silenciamiento de los genes y en la interferencia en el ARN (ARNi). El

silenciamiento génico es un proceso de regulación genética en el que un gen que normalmente se expresaría es “apagado” por un elemento intracelular, en este caso, el ARN pequeño. La proteína que normalmente se formaría mediante esta información genética no se forma debido a la interferencia, y la información codificada en el gen se bloquea desde su expresión.

Como se usa en la presente, el término “ARN pequeño” abarca moléculas de ARN descritas en la literatura como “ARN minúsculo” (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 codificante” (ncARN) eucariota; “micro-ARN (miARN)”; “no-mARN pequeño (snmARN)”; “ARN funcional (ARNf)”; “ARN de transferencia ARN (ARNt)”; “ARN catalítico” [por ejemplo, ribozimas, que incluye ribozimas autoacilantes (Illangaskare *et al.*, (1999) *ARN* 5:1482-1489); “ARN nucleolares pequeños (snoARN),” “tmARN” (también conocido como “10S ARN,” Muto *et al.*, (1998) *Trends Biochem Sci.* 23:25-29; y Gillet *et al.*, (2001) *Mol Microbiol.* 42:879-885); moléculas de ARNi que incluyen sin limitación “ARN de interferencia pequeño (siARN),” “siARN preparado con endorribonucleasa (e-siARN),” “ARN en horquilla corto (shARN),” y “ARN pequeño temporalmente regulado stARN),” “siARN cortado (d-siARN),” y aptámeros, oligonucleótidos y otros ácidos nucleicos sintéticos que comprenden por lo menos una base uracilo.

A menos que se explique específicamente de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo

significado que el comúnmente entendido por los expertos en la técnica a la que esta descripción pertenece. Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en, por ejemplo: Lewin, *Genes V*, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9);
 5 Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Como se usa en la presente, los artículos “un”, “una/uno” y “el/la”
 10 incluyen las referencias en plural a menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera clara y no ambigua.

III. Promotor del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* y ácidos nucleicos que lo comprenden

15 Se proporcionan métodos y composiciones para usar un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* para expresar transgenes no similares a los de metalotioneína en planta. En una modalidad, un promotor puede ser el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID
 20 NO: 1.

En una modalidad, se proporciona un polinucleótido que comprende un promotor, en donde el promotor tiene una identidad de por lo menos el 80, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% o 100% con respecto a la SEQ ID NO: 1. En una
 25 modalidad, un promotor es un promotor de un gen similar al de

metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que comprende un polinucleótido con una identidad de por lo menos el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% o 100% con el polinucleótido de la SEQ ID NO:1. En una modalidad, se

5 proporciona un polinucleótido aislado que comprende por lo menos una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% o 100% con el polinucleótido de la SEQ ID NO: 1. En una modalidad, se proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un promotor de un gen similar al de

10 metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO:1. En una modalidad, se proporciona un polinucleótido que comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que se une operativamente a un policonector. En una modalidad, se proporciona un casete de expresión génica que

15 comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que se une operativamente a un transgén no similar al de metalotioneína. En una modalidad, se proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que se une

20 operativamente a transgén no similar al de metalotioneína. En una modalidad, el promotor consiste en la SEQ ID NO: 1. En una modalidad ilustrativa, un vector de ácido nucleico comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que se une operativamente a un transgén, en donde el transgén puede ser

25 un transgén de resistencia a insecticida, un transgén de tolerancia a

herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN, un transgén de ARN pequeño, un transgén del marcador seleccionable, o combinaciones de éstos.

5 La expresión del transgén también puede regularse mediante la región del gen de la región 3'-no traducida (es decir, 3'-UTR) ubicado corriente abajo de la secuencia codificante del gen. Un promotor y una 3'UTR pueden regular la expresión del transgén. Mientras que es necesario un promotor para dirigir la transcripción, una región génica 3'-
10 UTR puede terminar la transcripción e iniciar la poliadenilación de un transcripto de ARNm resultante para la traducción y la síntesis de proteínas. Una región génica 3'-UTR ayuda a la expresión estable de un transgén.

En una modalidad, se proporciona un vector de ácido nucleico que
15 comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* como se describe anteriormente y una 3'-UTR. En una modalidad, el vector de ácido nucleico comprende una 3-UTR de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*. En una modalidad, la 3'-UTR de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*)
20 de *Brachypodium distachyon* es de la SEQ ID NO: 3.

En una modalidad, se proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* como se describe en la presente y la 3'-UTR en donde la 3'-UTR tiene una identidad de por lo menos el 80%, 85%,
25 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, o

100% con el polinucleótido de la SEQ ID NO:3. En una modalidad, se proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* como se describe en la presente y la 3'-UTR en donde el promotor de un

5 gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* y el 3'-UTR se unen operativamente a los extremos opuestos de un policonector. En una modalidad, se proporciona un casete de expresión génica que comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* como se describe en la

10 presente y una 3'-UTR, en donde el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* y la 3'-UTR se unen operativamente a los extremos opuestos de un transgén no similar a metalotioneína. En una modalidad la 3'-UTR, consiste en la SEQ ID NO: 3. En una modalidad, se proporciona un casete de expresión génica que

15 comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* como se describe en la presente y una 3'-UTR, en donde el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* comprende la SEQ ID NO: 1 y la 3'-UTR comprende la SEQ ID NO: 3 en donde el promotor y la 3'-UTR se unen

20 operativamente a los extremos opuestos de un transgén no similar a metalotioneína. En un aspecto de esta modalidad la 3'-UTR consiste en la SEQ ID NO: 3. En otro aspecto de esta modalidad el promotor consiste en la SEQ ID NO: 1. En una modalidad ilustrativa, un casete de expresión génica comprende una 3'-UTR de gen similar al de

25 metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que se une

operativamente a un transgén, en donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticida, un transgén de tolerancia a herbicida, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso de agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN, un transgén de ARN pequeño, un transgén del marcador seleccionable, o combinaciones de éstos. En una modalidad adicional el transgén se une operativamente a un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* y una 3'-UTR del mismo gen similar al de metalotioneína.

La expresión de los transgenes también puede regularse mediante una región de intrón ubicada corriente abajo de la secuencia promotora. Tanto un promotor como un intrón pueden regular la expresión transgénica. Si bien es necesario un promotor para impulsar la transcripción, la presencia de un intrón puede incrementar los niveles de expresión lo que resulta en un transcrito de ARNm para la traducción y la síntesis de proteínas. Una región génica de intrón ayuda en la expresión estable de un transgén. En modalidad adicional un intrón se une operativamente a un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*.

La expresión transgénica también puede regularse mediante una región 5'-UTR ubicada corriente abajo de la secuencia promotora. Tanto un promotor como una 5'-UTR pueden regular la expresión transgénica. Mientras que un promotor es necesario para conducir la transcripción, la presencia de una 5'-UTR puede incrementar los niveles de expresión que resulta en un transcrito de ARNm para la traducción y la síntesis

de proteínas. Una región génica 5'-UTR ayuda a la expresión estable de un transgén. En una modalidad adicional una 5'-UTR se une operativamente a un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*.

5 Un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* también puede comprender uno o más elementos de secuencia adicionales. En algunas modalidades, un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* puede comprender un exón (por ejemplo, un péptido líder o
10 señal tal como un péptido de tránsito de cloroplasto o señal de retención de ER). Por ejemplo y sin limitación, un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* puede codificar un exón incorporado en el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* como modalidad adicional.

15 En una modalidad, un vector de ácido nucleico comprende un casete de expresión génica como se describe en la presente. En una modalidad, un vector puede ser un plásmido, un cósmido, una cromosoma bacteriano artificial (BAC), un bacteriófago, un virus, o un fragmento de polinucleótido escindido para su uso en la transformación
20 directa o el direccionamiento de genes tales como un ADN donante.

De acuerdo con una modalidad se proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un casete de expresión génica recombinante en donde el casete de expresión génica recombinante comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium*
25 *distachyon* unida operativamente a una secuencia de policonector, un

transgén no similar al de metalotioneína o combinaciones de éstos. En una modalidad el casete de expresión génica recombinante comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unido operativamente a un transgén no similar

5 al de metalotioneína. En una modalidad el casete de expresión génica recombinante comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* como se describe en la presente se une operativamente a una secuencia de policonector. El policonector se une operativamente al promotor de un gen similar al de

10 metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de una manera tal que la inserción de una secuencia codificante en uno de los sitios de restricción del policonector se unirá operativamente a la secuencia codificante que permite la expresión de la secuencia codificante cuando el vector se transforma o se transfecta en una célula huésped.

15 De acuerdo con una modalidad el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1. De acuerdo con una modalidad el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*)

20 de *Brachypodium distachyon* comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1. De acuerdo con una modalidad la secuencia promotora tiene una longitud total de no más de 1,5, 2, 2,5, 3 o 4 kb. De acuerdo con una modalidad el promotor de un gen similar al de

25 metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* consiste en la SEQ ID

NO: 1 o en una secuencia de 2,000 pb que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1.

De acuerdo con una modalidad el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* consiste en la SEQ ID

5 NO: 1 o en una secuencia de 2,000 pb que tiene una identidad de secuencia del 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1.

Se proporciona además como una modalidad del promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*

Brachypodium distachyon la SEQ ID NO: 12. Esta secuencia promotora

10 modificada de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* puede usarse en la presente para impulsar la expresión de

un transgén, y proporcionar secuencias promotoras alternativas que pueden usarse en lugar de la SEQ ID NO: 1 como se proporciona en la

descripción sujeto de la presente. Las secuencias promotoras de los

15 polinucleótidos de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 12 comparten una identidad de secuencia del 97,5%. Se proporciona el promotor de la SEQ

ID NO: 12 como una modalidad adicional de un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*.

Se proporcionan además como modalidades del promotor de un gen

20 similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* la SEQ ID

NO: 7 (1,730 pb), SEQ ID NO: 8 (1,530 pb), SEQ ID NO: 9 (1,330 pb),

SEQ ID NO: 10 (1,130 pb) y SEQ ID NO: 11 (1,001 pb) como se muestra

en la Figura 2. Estas secuencias promotoras truncadas de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* pueden usarse

25 en la presente para impulsar la expresión de un transgén y proporcionar

secuencias promotoras alternativas que pueden usarse en lugar de la SEQ ID NO: 1 como se proporciona en la descripción sujeto de la presente. El promotor de 1,370 pb de la SEQ ID NO: 7 se proporciona como una modalidad adicional de un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*. Por otra parte, el promotor de 1,530 pb de la SEQ ID NO: 8 se proporciona como una modalidad adicional de un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*. El promotor de 1,330 pb de la SEQ ID NO: 9 se proporciona como una modalidad adicional de un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*. Además, el promotor de 1,130 pb de la SEQ ID NO: 10 se proporciona como una modalidad adicional de un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*. El promotor de 1,001 pb de la SEQ ID NO: 9 se proporciona como una modalidad adicional de un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*.

De acuerdo con una modalidad se proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un casete génico que consiste en un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*, un transgén no similar a metalotioneína y una 3'-UTR de gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 3. En una modalidad, el 3'-UTR de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 3 se une operativamente al extremo 3' del transgén no similar a metalotioneína. En otra modalidad la secuencia 3' no traducida

comprende la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80, 85, 90, 95, 99 o 100% con la SEQ ID NO: 3. En una modalidad adicional la secuencia 3' no traducida comprende la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene una identidad de

5 secuencia del 80, 85, 90, 95, 99 o 100% con la SEQ ID NO: 3. De acuerdo con una modalidad se proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un casete génico que consiste en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de 2,000 pb que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1, de transgén no

10 similar a metalotioneína y una 3'-UTR, en donde la SEQ ID NO: 1 se une operativamente al extremo 5' del transgén no similar a metalotioneína y la 3'-UTR de la SEQ ID NO:3 se une operativamente al extremo 3' del transgén no similar a metalotioneína. De acuerdo con una modalidad se proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un casete

15 génico que consiste en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de 2,000 pb que tiene una identidad de secuencia del 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1, un transgén no similar a metalotioneína y una 3'-UTR, en donde la SEQ ID NO: 1 se une operativamente al extremo 5' del transgén no similar a metalotioneína y la 3'-UTR de la SEQ ID NO:3 se

20 une operativamente al extremo 3' del transgén no similar a metalotioneína. En modalidad adicional la secuencia 3' no traducida comprende la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos del 80, 85, 90, 95, 99 o 100% con la SEQ ID NO: 3. En una modalidad adicional la secuencia 3' no traducida consiste

25 en la SEQ ID NO: 3 o una secuencia de 1,002 pb que tiene una identidad

de secuencia de por lo menos el 80, 85, 90, 95, 99% con la SEQ ID NO: 3. En una modalidad adicional la secuencia 3' no traducida comprende la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del por lo menos el 80, 85, 90, 95, 99% o 100 % con la SEQ ID NO: 3. En una modalidad adicional la secuencia 3' no traducida consiste en la SEQ ID NO: 3 o una secuencia de 1,002 pb que tiene una identidad de secuencia del 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 3.

Se proporciona, además, como modalidad de la 3'-UR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* la SEQ ID NO: 17 y la SEQ ID NO: 18. Estas secuencias modificadas de 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* pueden usarse en la presente para terminar la expresión de un transgén, y para proporcionar secuencias de 3'-UTR alternativas que pueden usarse en lugar de SEQ ID NO: 3 como se proporciona en la descripción sujeto de la presente. Las secuencias de 3'-UTR de los polinucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y de la SEQ ID NO: 17 comparten una identidad de secuencia del 94,4 94,2 %. Las secuencias de 3'-UTR de los polinucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 18 comparten una identidad de secuencia del 97,5%. Finalmente, las secuencias de 3'-UTR de los polinucleótidos de la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 17 comparten una identidad de secuencia del 92,7%. La 3'-UTR de la SEQ ID NO: 17 se proporciona como una modalidad adicional de un 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*. La 3'-UTR de la SEQ ID NO: 18 se proporciona como una modalidad adicional de una 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de

Brachypodium distachyon.

Se proporcionan como modalidades de la 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* la SEQ ID NO: 13 (264 pb), la SEQ ID NO: 14 (332 pb), la SEQ ID NO: 15 (630 pb) y la

5 SEQ ID NO: 16 (727 pb) como se muestra en la Figura 4. Estas secuencias truncadas de 3'-UTR de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* pueden usarse en la presente para terminar la expresión de un transgén, y proporcionar secuencias de 3-UTR alternativas que puedan usarse en lugar de la SEQ ID NO: 3 como

10 se proporciona en la descripción sujeto de la presente. La 3'-UTR de 264 pb de la SEQ ID NO: 13 se proporciona como una modalidad adicional de una 3'-UTR de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*. Por otra parte, la 3'-UTR de la SEQ ID NO: 14 se proporciona como una modalidad adicional de una 3'-UTR de un gen

15 similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*. La 3'-UTR de 630 pb de la SEQ ID NO: 15 se proporciona como una modalidad adicional de una 3'-UTR un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*. Además, la 3'-UTR de 727 pb de la SEQ ID NO: 16 se proporciona como una modalidad adicional de una 3'-UTR de

20 un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*.

En una modalidad se proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende un promotor y un transgén no similar a metalotioneína y opcionalmente uno o más de los siguientes elementos:

- a) una región 5' no traducida;
- 25 b) un intrón; y

c) una región 3' no traducida,

en donde,

el promotor consiste en la SEQ ID NO: 1 o en una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 98% con la SEQ ID NO: 1; y

5 la región 3' no traducida consiste en la SEQ ID:3 o en una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 98% con la SEQ ID NO:3; en donde además dicho promotor se une operativamente a dicho transgén y cada elemento opcional, si se encuentra presente, también se une operativamente tanto al promotor como al transgén. En una
10 modalidad adicional se proporciona una célula transgénica que comprende el constructo de ácido nucleico divulgado anteriormente. En una modalidad la célula transgénica es una célula de planta, y en una modalidad se proporciona una planta en donde la planta comprende dichas células transgénicas.

15 En una modalidad se proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende un promotor y un transgén no similar a metalotioneína y opcionalmente uno o más de los siguientes elementos:

a) una región 3' no traducida,

en donde,

20 el promotor consiste en la SEQ ID NO: 1 o en una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 98% con respecto a la SEQ ID NO: 1; y

 la región 3' no traducida consiste en la SEQ ID NO: 3 o en una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 98% con la SEQ ID
25 NO: 3; en donde además dicho promotor se une operativamente a dicho

transgén y cada elemento opcional, cuando se encuentra presente, se une operativamente, además, tanto al promotor como al transgén. En una modalidad se proporciona una célula transgénica que comprende el constructo de ácido nucleico descrito en lo que precede inmediatamente.

- 5 En una modalidad la célula transgénica es una célula de planta, y en una modalidad se proporciona una planta en donde la planta comprende dichas células transgénicas.

En una modalidad se proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende un promotor y un policonector y opcionalmente uno o
10 más de los siguientes elementos:

- a) una región 5' no traducida,
- b) un intrón, y
- c) una región 3' no traducida,

en donde,

- 15 el promotor consiste en la SEQ ID NO: 1 o en una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 98% con la SEQ ID NO: 1; y

la región 3' no traducida consiste en la SEQ ID NO:3 o en una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 98% con la SEQ ID NO:3; en donde además dicho promotor se une operativamente a dicho
20 policonector y cada elemento opcional, si se encuentra presente, también se une operativamente tanto al promotor como al policonector.

De acuerdo con una modalidad el vector de ácido nucleico comprende además una secuencia que codifica un marcador seleccionable. De acuerdo con una modalidad el casete génico
25 recombinante se une operativamente a un borde de T-ADN de

Agrobacterium. De acuerdo con una modalidad el casete génico recombinante comprende además un primer y un segundo borde de T-ADN, en donde el primer borde de T-ADN se une operativamente a uno de los extremos del constructo de gen, y el segundo borde de T-ADN está operativamente ligado se une operativamente al otro extremo del constructo génico. Los bordes primero y segundo de T-ADN de *Agrobacterium* pueden seleccionarse independientemente de las secuencias borde de T-ADN que se originan a partir de las cepas bacterianas seleccionadas del grupo que consiste en un borde de T-ADN de *Agrobacterium* que sintetiza nopalina, un borde de T-ADN de *Agrobacterium* que sintetiza octopina, un borde de T-ADN de *Agrobacterium* que sintetiza manopina, un borde de T-ADN de *Agrobacterium* que sintetiza succinamopina, o cualquier combinación de éstos. En una modalidad se proporciona una cepa de *Agrobacterium* seleccionada del grupo que consiste en una cepa que sintetiza nopalina, una cepa que sintetiza mannopina, una cepa que sintetiza succinamopina, o una cepa que sintetiza octopina, en donde dicha cepa comprende un plásmido en donde el plásmido comprende un transgén unido operativamente a una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO:1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1.

Los transgenes de interés que son adecuados para el uso en los constructos divulgados en la presente incluyen, sin limitación, secuencias codificantes que confieren: (1) resistencia a las plagas o a las enfermedades; (2) tolerancia a los herbicidas; (3) rasgos de interés

agronómico de valor añadido, tales como; mejoría del rendimiento, eficiencia en el uso del nitrógeno, eficiencia en el uso del agua y calidad nutricional; (4) unión de una proteína al ADN de una manera específica de sitio; (5) expresión de ARN pequeño; y (6) marcadores seleccionables. De acuerdo con una modalidad, el transgén codifica un
 5 marcador seleccionable o uno producto génico que confiere resistencia a los insecticidas, tolerancia a los herbicidas, expresión de ARN pequeño, eficiencia en el uso del nitrógeno, eficiencia en el uso del agua, o calidad nutricional.

10

1. Resistencia a los insectos

Varias secuencias codificantes de resistencia a insectos pueden unirse operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que comprende la SEQ
 15 ID NO: 1, o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1. Diversas secuencias codificantes de resistencia a insectos pueden unirse operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que comprende la SEQ ID NO: 1 o una
 20 secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1. Las secuencias unidas operativamente pueden incorporarse después en un vector elegido para permitir la identificación y selección de plantas transformadas ("transformantes"). En la técnica se conocen secuencias codificantes de resistencia a
 25 insectos ilustrativas. Como modalidades de secuencias codificantes de

resistencia a insectos que pueden unirse operativamente a los elementos reguladores de la descripción sujeto, se proporcionan los siguientes rasgos. Las secuencias codificantes que proporcionan resistencia a insectos lepidópteros ilustrativos incluyen: *cry1A*;

5 *cry1A.105*; *cry1Ab*; *cry1Ab* (truncado); *cry1Ab-Ac* (proteína de fusión); *cry1Ac* (comercializado como Widestrike®); *cry1C*; *cry1F* (comercializado como Widestrike®); *cry1Fa2*; *cry2Ab2*; *cry2Ae*; *cry9C*; *mocry1F*; *pinII* (proteína inhibidora de proteasas); *vip3A(a)*; y *vip3Aa20*. Las secuencias codificantes que proporcionan resistencia a insectos

10 coleópteros incluyen: *cry34Ab1* (comercializado como Herculex®); *cry35Ab1* (comercializado como Herculex®); *cry3A*; *cry3Bb1*; *dvsnf7*; y *mcry3A*. Las secuencias codificantes que proporcionan resistencia a múltiples insectos incluyen *ecry31.Ab*. La lista anterior de genes de resistencia a insectos no tiene por objeto ser limitante. La presente

15 descripción abarca la totalidad de los genes de resistencia a insectos.

2. Tolerancia a los herbicidas

Diversas secuencias codificantes de tolerancia a los herbicidas unirse operativamente al promotor de un gen similar al de

20 metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1. Diversas secuencias codificantes de resistencia a herbicidas pueden unirse operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*)

25 de *Brachypodium distachyon* que comprende la SEQ ID NO: 1 o una

secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1. Las secuencias unidas operativamente pueden incorporarse después en un vector elegido adecuado para permitir la identificación y selección de plantas transformadas (‘transformantes’). Las secuencias codificantes de tolerancia a herbicidas ilustrativas se conocen en la técnica. Como modalidades de secuencias codificantes de tolerancia a herbicidas que pueden unirse operativamente a los elementos reguladores de la descripción de la presente, se proporcionan los siguientes rasgos. El herbicida glifosato contiene un modo de acción mediante la inhibición de la enzima EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa). Esta enzima está implicada en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos que son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. En la técnica se conocen diversos mecanismos que pueden usarse para inhibir esta enzima. Los genes que codifican tales enzimas pueden unirse operativamente a los elementos reguladores de genes de la presente descripción. En una modalidad, los genes marcadores seleccionables incluyen, sin limitación genes que codifican resistencia al glifosato, estos genes incluyen: genes de EPSPS mutantes tales como los genes *2mEPSPS*, los genes *cp4 EPSPS*, los genes *mEPSPS*, los genes *dgt-28*, los genes *aroA*; y los genes de degradación del glifosato tales como los genes de glifosato acetil transferasa (*gat*) y los genes de glifosato oxidasa (*gox*). Estos rasgos se comercializan actualmente como Gly-TolTM, Optimum® GAT®, Agrisure® GT y Roundup Ready®. Los genes de resistencia para los compuestos glufosinato y/o bialafos incluyen los genes *dsm-2*, *bar* y *pat*.

Los rasgos *bar* y *pat* se comercializan actualmente como LibertyLink®. También se incluyen genes de tolerancia que proporcionan resistencia a 2,4-D tales como los genes *aad-1* (debe notarse que los genes *aad-1* tienen además una actividad sobre los herbicidas de ariloxifenoxipropionato) y los genes *aad-12* (debe notarse que los genes *aad-12* tienen además una actividad sobre las auxinas sintéticas de piridiloxiacetato). Estos rasgos se comercializan como tecnología de protección de cultivos Enlist®. Los genes de resistencia para los inhibidores de ALS (sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidiniltiobenzoatos y sulfonilamino-carbonil-triazolinonas) se conocen en la técnica. Estos genes de resistencia resultan con más frecuencia de mutaciones puntuales en la secuencia génica codificantes de ALS. Otros genes de resistencia al inhibidor de ALS incluyen los genes *hrr*, los genes *csr1-2*, los genes *Sr-HrA* y los genes *surB*. Algunos de los rasgos se comercializan bajo el nombre comercial Clearfield®. Los herbicidas que inhiben HPPD incluyen las pirazolonas tales como pirazoxifeno, benzofenap y topamezona; tricetonas tales como mesotriona, sulcotriona, tembotriona, benzobiciclona; y dicetonitrilos tales como isoxaflutol. Estos herbicidas de HPPD ilustrativos pueden tolerarse mediante rasgos conocidos. Los ejemplos de inhibidores de HPPD incluyen los genes *hppdPF_W336* (para resistencia a isoxaflutol) y los genes *avhppd-03* (para resistencia a meotriona). Un ejemplo de rasgos tolerantes al herbicida oxinilo incluye el gen *bxn*, que ha demostrado impartir resistencia al herbicida/antibiótico bromoxinilo. Los genes de resistencia para dicamba incluyen el gen de dicamba

monooxigenasa (*dmo*) como se divulga en la publicación PCT internacional núm. WO2008/105890. Los genes de resistencia a herbicidas de tipo inhibidor de PPO o PROTOX (por ejemplo, acifluorfen, butafenacilo, flupropazilo, pentoxazona, carfentrazona, fluazolato, piraflufen, aclonifeno, azafenidina, flumioxazin, flumiclorac, bifenox, oxifluorfen, lactofeno, fomesafeno, fluoroglicofeno y sulfentrazona) se conocen en la técnica. Los genes ilustrativos que confieren resistencia a PPO incluyen la sobreexpresión de una enzima PPO de taliana *Arabidopsis* de tipo salvaje (Lermontova I y Grimm B, (2000). Overexpression of plastidic protoporphyrinogen IX oxidase leads to resistance to the diphenyl-ether herbicide acifluorfen. *Plant Physiol* **122**:75–83.), el gen PPO de *B. subtilis* (Li, X. y Nicholl D. 2005. Development of PPO inhibitor-resistant cultures and crops. *Pest Manag. Sci.* 61:277-285 y Choi KW, Han O, Lee HJ, Yun YC, Moon YH, Kim MK, Kuk YI, Han SU y Guh JO, (1998) Generation of resistance to the diphenyl ether herbicide, oxifluorfen, *via* expression of the *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene in transgenic tobacco plants. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**:558–560.) Los genes de Resistencia para ácidos piridinoxi o fenoxi propiónicos y ciclohexonas incluyen los genes codificantes del inhibidor de ACCasa (por ejemplo, Acc1-S1, Acc1-S2 y Acc1-S3). Los genes ilustrativos que confieren resistencia a ciclohexanodionas y/o ácido ariloxifenoxipropanoico incluyen haloxifop, diclofop, fenoxiprop, fluazifop y quizalofop. Finalmente, los herbicidas pueden inhibir la fotosíntesis, que incluyen triazina o benzonitrilo se proporcionan por los genes *psbA* (tolerancia a triazina), genes *1s*

(tolerancia a triazina) y genes *nitrilasa* (tolerancia a benzonitrilo). La lista anterior de genes de tolerancia a herbicidas no tiene por objeto ser limitante. Todos los genes de tolerancia a los herbicidas se abarcan en la presente descripción.

5

3. Rasgos de interés agronómico

Diversas secuencias codificantes de rasgos de interés agronómico pueden unirse operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que comprende la SEQ ID NO: 1, o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1. Diversas secuencias codificantes de rasgos de interés agronómico pueden unirse operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que comprende la SEQ ID NO: 1 o una

10 ID NO: 1, o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1. Diversas secuencias codificantes de rasgos de interés agronómico pueden unirse operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que comprende la SEQ ID NO: 1 o una

15 secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1. Las secuencias unidas operativamente pueden incorporarse después en un vector elegido para permitir la identificación y selección de plantas transformadas (“transformantes”). Las secuencias codificantes de rasgos de interés agronómico se

20 conocen en la materia. Como modalidades de secuencias codificantes de rasgos de interés agronómico que pueden unirse operativamente a los elementos reguladores de la presente descripción, se proporcionan los siguientes rasgos. El retardo del ablandamiento de los frutos provisto como se proporciona por los genes *pg* inhibe la producción de

25 la enzima poligalacturonasa responsable de la descomposición de las

moléculas de pectina en la pared de las células, y por lo tanto con lo que ocasiona un ablandamiento retardado del ablandamiento de los frutos. Además, el retardo de la maduración/senescencia retardada de los frutos o de su senescencia por de los genes *acc* actúan de manera

5 de para suprimir la expresión normal del gen de *acc sintasa* nativo, lo que resulta en una producción reducida de etileno y un retardo de la maduración retardada de los frutos. Por cuanto, los genes *accd* metabolizan el precursor de la hormona etileno para la maduración de los frutos, lo que resulta en la maduración retardada de los frutos. Como

10 alternativa, los genes *sam-k* ocasionan la maduración retardada por la reducción de la S-adenosilmetionina (SAM), un sustrato para la producción de etileno. Los fenotipos de tolerancia al estrés por sequía se proporcionan por los genes *cspB* que mantienen las funciones normales celulares bajo condiciones de estrés hídrico mediante la

15 conservación de la estabilidad y traducción del ARN. Otro ejemplo incluye los genes *EcBetA* que catalizan la producción del compuesto osmoprotector glicina betaína que confiere tolerancia al estrés hídrico. Por otra parte, los genes *RmBetA* catalizan la producción del compuesto osmoprotector glicina betaína que confieren una tolerancia al estrés

20 hídrico. La potenciación de la fotosíntesis y del rendimiento se proporciona con el gen *bbx32* que expresa una proteína que interactúa con uno o más factores de transcripción endógenos para regular los procesos fisiológicos diurnos/nocturnos de la planta. La producción del etanol puede incrementarse mediante la expresión de los genes

25 *amy797E* que codifican una enzima alfa-amilasa termoestable que

potencia la producción de bioetanol mediante el incremento de la termoestabilidad de la amilasa usada en la degradación del almidón. Finalmente, las composiciones de aminoácidos modificadas pueden resultar de la expresión de los genes *cordapA* que codifican una enzima dihidrodipicolinato sintasa que incremente la producción del aminoácido lisina. La lista anterior de secuencias codificantes de rasgos de interés agronómico no tiene por objeto ser limitante. La presente descripción abarca la totalidad de las secuencias codificantes de rasgos de interés agronómico.

10

4. Proteínas de unión al ADN

Diversas secuencias codificantes de proteínas de unión al ADN pueden unirse operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80, 85, 90, 95 o 99% con respecto a la SEQ ID NO: 1. Diversas secuencias codificantes de proteínas de unión al ADN pueden unirse operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1. Las secuencias unidas operativamente pueden incorporarse después en un vector elegido para permitir la identificación y selección de plantas transformadas ("transformantes"). Las secuencias codificantes de unión al ADN ilustrativas se conocen en la técnica. Como modalidades de secuencias

25

codificantes de unión al ADN que pueden unirse operativamente a los elementos reguladores de la presente descripción, los siguientes tipos de proteínas de unión al ADN pueden incluir: dedos de cinc, Talens, CRISPRS y meganucleasas. La lista anterior de secuencias codificantes de unión al ADN no tiene por objeto ser limitante. La presente descripción abarca la totalidad de la secuencias codificantes de unión al ADN.

5. ARN pequeño

Varios ARN pueden unirse operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* a una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1. Varios ARN pequeños pueden unirse operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1. Las secuencias unidas operativamente pueden incorporarse después en un vector elegido para permitir la identificación y selección de plantas transformadas ("transformantes"). Los rasgos ilustrativos del ARN pequeño se conocen en la técnica. Como modalidades de secuencias codificantes de ARN pequeño que pueden unirse operativamente a los elementos reguladores de la descripción sujeto, se proporcionan los siguientes rasgos. Por ejemplo, la maduración/senescencia retardada de los frutos del ARN pequeño *anti-efe* retarda la maduración mediante la supresión de la

producción de etileno a través del silenciamiento del gen ACO que codifica una enzima formadora de etileno. La producción alterada de lignina por el ARN pequeño *ccomt* reduce el contenido de la guanacil (G) lignina mediante la inhibición de la S-adenosil-L-metionina endógena:

5 trans-caffeoil CoA 3-O-metiltransferasa (gen CCOMT). Además, la tolerancia a los magullones de las manchas oscuras en *Solanum verrucosum* puede reducirse mediante el ARN pequeño *Ppo5* que desencadena la degradación de los transcritos de *Ppo5* para bloquear el desarrollo de los magullones de las manchas oscuras. También se

10 incluye el ARN pequeño *dvsnf7* que inhibe el Gusano Oriental de las Raíces del Maíz con ARNbc que contiene un fragmento de 240 pb del gen *Snf7* del Gusano Oriental de las Raíces del Maíz. El almidón/carbohidrato modificado puede resultar del ARN pequeño tal como el ARN pequeño *pPhL* (degrada los transcritos PhL para limitar la

15 formación de azúcares reductores mediante la degradación del almidón) y del ARN pequeño *pR1* (degrada los transcritos de R1 para limitar la formación de azúcares reductores mediante la degradación del almidón). Adicionalmente, beneficios tales como una acrilamida reducida que resulta del ARN pequeño *asn1* que desencadena la degradación de Asn1

20 para deteriorar la formación de asparagina y de reducir la de poliacrilamida. Finalmente, el fenotipo no pardo del ARN pequeño de supresión de *pgas ppo* resulta en la supresión de PPO para producir manzanas con un fenotipo no pardo. La lista anterior de los ARN pequeños no tiene por objeto ser limitante. La presente descripción

25 abarca la totalidad de las secuencias codificantes de ARN pequeños.

6. Marcadores seleccionables

Varios marcadores seleccionables, también descritos como genes reporteros, pueden unirse operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80, 85, 90, 95 o 99% con la SEQ ID NO: 1. Varios marcadores seleccionables también descritos como genes reporteros pueden unirse operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80, 85, 90, 95 o 98% con la SEQ ID NO: 1. Las secuencias unidas operativamente pueden incorporarse después en un vector de expresión elegido para permitir la identificación y selección de plantas transformadas ("transformantes"). Existen muchos métodos disponibles para confirmar la expresión de marcadores seleccionables en plantas transformadas, que incluyen por ejemplo, secuenciación de ADN y PCR (reacción en cadena de polimerasa), transferencia en membrana de Southern, transferencia de ARN, métodos inmunológicos para la detección de una proteína expresada a partir del vector. Pero, usualmente se observan los genes reporteros mediante la observación visual de proteínas cuando se expresan producen un producto de color. Los reporteros ilustrativos se conocen en la técnica y codifican β -glucuronidasa (GUS), luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YFP, Phi-YFP), proteína fluorescente roja

(DsRFP, RFP, etc. etcétera), *β-galactosidasa* y similares (ver Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera edición, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia en su totalidad).

5 Los genes marcadores seleccionables se utilizan para la selección de células o tejidos transformados. Los genes marcadores seleccionables incluyen genes que codifican para la resistencia a antibióticos, tales como aquellos que codifican neomicina fosfotransferasa II (NEO), resistencia a espectinomina /
10 estreptinomina (AAD), y la higromicina fosfotransferasa (HPT o HGR)) así como también genes que confiere resistencia a compuestos herbicidas. Los genes de resistencia a herbicidas en términos generales codifican para una proteína objetivo modificada insensible al herbicida o para una enzima que degrada o desintoxica el herbicida en la planta
15 antes de que pueda actuar. Por ejemplo, la resistencia al glifosato se ha obtenido mediante el uso de genes que codifican para enzimas objetivos mutantes, 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Los genes y mutantes para EPSPS se conocen bien, y se describen adicionalmente a continuación. La resistencia al glufosinato amonio, bromoxinilo, y 2,4-
20 diclorofenoxiacetato (2,4-D) se ha obtenido mediante el uso de genes bacterianos que codifican PAT o DSM-2, una nitrilasa, AAD-1 o AAD-12, cada uno de los cuales son ejemplos de proteínas que desintoxican sus respectivos herbicidas.

En una modalidad, los herbicidas pueden inhibir el punto de
25 crecimiento o meristemo, que incluyen imidazolinona o sulfonilurea, y

los genes para resistencia/tolerancia de acetohidroxiácido sintasa (AHAS) y de acetolactato sintasa (ALS) para estos herbicidas se conocen bien. Los genes de resistencia a glifosato incluyen la 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSP) mutante y los genes *dgt-*
5 28 (a través de la introducción de ácidos nucleicos recombinantes y/o de diversas formas de mutagénesis *in vivo* de genes nativos de EPSP), genes de *aroA* y genes de glifosato acetil transferasa (GAT), respectivamente). Los genes de resistencia para otros compuestos fosfono incluyen genes *bar* y *pat* de especies de *Streptomyces*, lo que
10 incluye *Streptomyces hygroscopicus* y *Streptomyces viridichromogenes*, y ácidos piridinoxi o fenoxi propiónicos y ciclohexonas (genes codificantes del inhibidor ACCasa). Los ejemplos ilustrativos de genes que confieren resistencia a ciclohexanodionas y/o ácido ariloxifenoxipropanoico (que incluye Haloxifop, Diclofop, Fenoxiprop,
15 Fluazifop, Quizalofop) incluyen genes de acetil coenzima A carboxilasa (ACCasa; Acc1-S1, Acc1-S2 y Acc1-S3. En una modalidad, los herbicidas pueden inhibir la fotosíntesis, que incluyen triazina (genes *psbA* y *1s+*) o benzonitrilo (gen nitrilasa). Por otra parte, tales marcadores seleccionables de este tipo pueden incluir marcadores de
20 selección positivos tales como la enzima fosfomannosa isomerasa (PMI).

En una modalidad, los genes marcadores seleccionables incluyen, sin limitación genes que codifican: 2,4-D; neomicina fosfotransferasa II; cianamida hidratasa; aspartato cinasa; dihidrodipicolinato sintasa; triptófano decarboxilasa; dihidrodipicolinato sintasa y aspartato quinasa
25 desensibilizada; gen de *bar*; triptofano decarboxilasa; neomicina

fosfotransferasa (NEO); higromicina fosfotransferasa (HPT o HYG); dihidrofolato reductasa (DHFR); fosfinotricina acetiltransferasa; ácido 2,2-dicloropropiónico dehalogenasa; acetohidroxiácido sintasa; 5-enolpiruvil-shiquimato-fosfato sintasa (aroA); haloarilnitrilasa; acetil-coenzima A carboxilasa; dihidropteroato sintasa (sul I); y polipéptido de fotosistema II de 32 kD (psbA). Una modalidad también incluye genes de marcadores seleccionables que codifican resistencia a: cloramfenicol; metotrexato; higromicina; espectinomomicina; bromoxinilo; glifosato; y fosfinotricina. La lista precedente de marcadores seleccionables no tiene por objeto ser limitante. La presente descripción tiene por objeto abarcar la totalidad de los genes reporteros o genes marcadores seleccionables.

En algunas modalidades las secuencias codificantes se sintetizan para la expresión óptima en una planta. Por ejemplo, en una modalidad, una secuencia codificante de un gen se ha modificado mediante optimización de codón para potenciar la expresión en las plantas. Un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN o un transgén de marcador seleccionable optimizarse para la expresión en una especie de planta particular o como alternativa, puede modificarse para la expresión óptima en plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas. Los codones preferidos para plantas pueden determinarse a partir de los codones de mayor frecuencia en las proteínas expresadas en la cantidad más grande en la especie de planta particular de interés. En una modalidad, se diseña una secuencia

codificante, gen, o transgén para que se exprese en plantas en un nivel superior, lo que resulta una mayor eficiencia de la transformación. Los métodos para la optimización de genes en las plantas se conocen bien. Puede encontrarse una orientación en cuanto a la optimización y
5 producción de secuencias de ADN sintéticas en por ejemplo, los documentos WO2013016546, WO2011146524, WO1997013402, la patente de los EE.UU. núm. 6166302, y núm. 5380831, incorporarlos en la presente como referencia.

10 Transformación

Los métodos adecuados para la transformación de plantas incluyen cualquier método para introducir ADN en una célula, por ejemplo y sin limitación: electroporación (ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. 5,384,253); bombardeo con microproyectiles (ver, por ejemplo, las
15 patentes de los EE.UU. 5,015,580; 5,550,318; 5,538,880; 6,160,208; 6,399,861; y 6,403,865); la transformación mediada por *Agrobacterium* (ver, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. 5,635,055; 5,824,877; 5,591,616; 5,981,840; y 6,384,301); y la transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. 5,508,184).

20 Un constructo de ADN puede introducirse directamente en el ADN genómico de la célula de planta mediante el uso de técnicas tales como la agitación con fibras de carburo de silicio (ver, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. 5,302,523 y 5,464,765), o los constructos de ADN pueden introducirse directamente en el tejido de planta mediante
25 métodos biolísticos, tales como el bombardeo con partículas de ADN

(ver, por ejemplo, Klein *et al.*, (1987) *Nature* 327:70-73). Como alternativa, el constructo de ADN puede introducirse en la célula de la planta mediante transformación de nanopartículas (ver, por ejemplo, la publicación de patente de los EE.UU. 20090104700, incorporado en la
5 presente en su totalidad como referencia).

Además, la transferencia de genes puede lograrse mediante el uso de bacterias no *Agrobacterium* o virus tales como *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, virus X de la papa, virus del mosaico de coliflor y virus del mosaico de vena de
10 mandioca y/o virus del mosaico del tabaco (ver, por ejemplo, Chung *et al.*, (2006) *Trends Plant Sci.* 11(1):1-4).

Mediante la aplicación de técnicas de transformación, las células de virtualmente cualquier especie de planta pueden transformarse establemente, y estas células pueden desarrollarse en plantas
15 transgénicas mediante técnicas bien conocidas. Por ejemplo, las técnicas que pueden ser particularmente útiles en el contexto de la transformación de algodón se describen en las patentes de los EE.UU. 5,846,797; 5,159,135; 5,004,863; y 6,624,344; las técnicas para transformar plantas *Brassica* se describen en particular en por ejemplo
20 la patente de los EE.UU. 5,750,871; las técnicas para transformar frijol de soya se describen en, por ejemplo, la patente de los EE.UU. 6,384,301; y las técnicas para transformar maíz se describen en, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. 7,060,876 y 5,591,616, y en la publicación internacional PCT WO 95/06722.

25 Después de efectuar la entrega de un ácido nucleico exógeno a una

célula receptora, por lo general se identifica una célula transformada para su cultivo adicional y para la regeneración de la planta. A fin de mejorar la capacidad de identificar transformantes, puede ser deseable emplear un gen marcador seleccionable de gen con el vector de transformación usado para generar el transformante. En una modalidad ilustrativa, puede evaluarse una población de células transformadas mediante la exposición de las células a uno o más agentes selectivos, las células pueden someterse a un tamizaje para el rasgo deseado para el marcador genético.

10 Las células que sobreviven a la exposición a un agente selectivo, o las células que han recibido un puntaje positivo en un ensayo de tamizaje, pueden cultivarse en un medio que apoya la regeneración de las plantas. En una modalidad, cualquier medio de cultivo de tejidos de plantas adecuado puede modificarse mediante la introducción de
15 sustancias adicionales, tales como reguladores del crecimiento. El tejido puede mantenerse en un medio básico con reguladores del crecimiento hasta que se disponga de suficiente tejido para comenzar los esfuerzos de regeneración de plantas, o después de repetidas rondas de selección manual, hasta que la morfología del tejido sea la adecuada para la
20 regeneración (por ejemplo, por lo menos 2 semanas), luego se transfiere a un medio para propiciar la formación de brotes. Los cultivos se transfieren periódicamente hasta que se formen suficiente brotes. Una vez que se forman los brotes, se transfieren a medios que conducen a propician la formación de raíces. Una vez que se han formado forman
25 suficientes raíces, las plantas pueden transferirse al suelo para mayor

crecimiento y madurez.

Confirmación molecular

Una célula transformada de la planta, callos, tejido o planta pueden
5 identificarse y aislarse mediante selección o tamizaje del material de
planta diseñado mediante ingeniería genética para los rasgos
codificados por los genes marcadores presentes en el ADN de
transformación. Por ejemplo, la selección puede efectuarse mediante el
cultivo del material de planta diseñado mediante ingeniería genética en
10 un medio que contiene una cantidad inhibidora del antibiótico o
herbicida al cual el constructo génico de transformación confiere una
resistencia. Además, las plantas y las células de plantas transformadas
también pueden identificarse mediante el tamizaje para las actividades
de cualquier gen marcador visible (por ejemplo, los genes de β -
15 glucuronidasa, luciferasa o *gfp*) que puedan encontrarse en los
constructos de ácido nucleico recombinante. Tales metodologías de
selección y de tamizaje son bien conocidos por los expertos en la
técnica. Los métodos para la confirmación molecular que pueden usarse
para identificar plantas transgénicas son conocidos por el experto en la
20 técnica. Varios métodos ilustrativos se describen además a
continuación.

Se han descrito balizas moleculares para su uso en la detección de
secuencias. En pocas palabras, se diseña una sonda de oligonucleótidos
FRET que se superpone a la unión del ADN genómico flanqueante y del
25 inserto. La estructura única de la sonda FRET resulta en que esta

contiene una estructura secundaria que mantiene las porciones fluorescentes y de apagado en estrecha proximidad. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia de ADN del inserto y uno en la secuencia genómica flanqueante) se someten a ciclos en presencia de una polimerasa termoestable y de los dNTP. Después de la amplificación por PCR exitosa, la hibridación de la(s) sonda(s) FRET con la secuencia objetivo tiene como resultado la eliminación de la estructura secundaria de la sonda y la separación espacial de las porciones fluorescentes y de apagado. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia genómica flanqueante/inserto de transgén debido a la amplificación e hibridación exitosas. Un ensayo de baliza molecular para la detección como una reacción de amplificación es una modalidad de la presente descripción.

El ensayo de sonda por hidrólisis, también conocido como TAQMAN® (Life Technologies, Foster Citi, Calif.), es un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN. En pocas palabras, se diseña una sonda de oligonucleótidos FRET con un oligo dentro del transgén y uno en la secuencia genómica flanqueante para la detección específica del evento. La sonda FRET y los cebadores de PCR (un cebador en la secuencia del inserto de ADN y uno en la secuencia genómica flanqueante) se someten a ciclos en presencia de una polimerasa termoestable y los dNTP. La hibridación de la sonda FRET tiene como resultado la escisión y liberación de la porción fluorescente con respecto a la porción de desactivación en la sonda FRET. Una señal fluorescente indica la presencia de la secuencia de inserto

flanqueante/transgén debido a la amplificación e hibridación exitosas. Un ensayo de sonda por hidrólisis para la detección de una reacción de amplificación es una modalidad de la presente descripción.

Los ensayos KASPar® son un método para detectar y cuantificar la presencia de una secuencia de ADN. En pocas palabras, la muestra de ADN genómico que comprende el polinucleótido de casete de expresión génica integrado se tamiza mediante un ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) conocido como sistema de ensayo KASPar®. El ensayo Kaspar® usado en la práctica de la presente descripción puede utilizar una mezcla de ensayo de PCR de KASPar® que contiene múltiples cebadores. Los cebadores usados en la mezcla del ensayo de PCR pueden comprender por lo menos un cebador directo y por lo menos un cebador inverso. El cebador directo contiene una secuencia correspondiente a una región específica del polinucleótido del ADN, y el cebador inverso contiene una secuencia correspondiente a una región específica de la secuencia genómica. Además, los cebadores usados en la mezcla del ensayo de PCR pueden comprender por lo menos un cebador directo y por lo menos un cebador inverso. Por ejemplo, la mezcla del ensayo de PCR de KASPar® puede usar dos cebadores directos correspondientes a dos alelos diferentes y un cebador inverso. Uno de los cebadores directos contiene una secuencia correspondiente a una región específica de la secuencia genómica endógena. El segundo cebador directo contiene una secuencia correspondiente a una región específica del polinucleótido de ADN. El cebador inverso contiene una secuencia correspondiente a una región

específica de la secuencia genómica. Un ensayo KASPar® de este tipo para la detección de una reacción de amplificación es una modalidad de la presente descripción.

En algunas modalidades la señal fluorescente o colorante fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante HEX fluorescente, un colorante FAM fluorescente, un colorante JOE fluorescente, un colorante TET fluorescente, un colorante Cy 3 fluorescente, un tinte Cy 3.5 fluorescente, un colorante Cy 5 fluorescente, un colorante Cy 5.5 fluorescente, un colorante Cy 7 fluorescente y un colorante ROX fluorescente.

En otras modalidades se lleva a cabo la reacción de amplificación mediante el uso de colorantes de ADN fluorescentes secundarios adecuados que son capaces de teñir el ADN celular en un intervalo de concentración detectable mediante citometría de flujo, y que tienen un espectro de emisión fluorescente que es detectable mediante un termociclador en tiempo real. Se apreciará por los expertos en la técnica que se conocen otros colorantes de ácido nucleico se identifican de manera continua. Puede emplearse cualquier colorante de ácido nucleico adecuado con espectros de excitación y emisión adecuados, tales como YO-PRO-1®, SYTOX Green®, SYBR Green I®, SYTO11®, SYTO12®, SYTO13®, BOBO®, YOYO® y TOTO®. En una modalidad, se utiliza un segundo colorante de ADN fluorescente es SYTO13® utilizado a menos de 10 μ M, menos de 4 μ M, o menos de 2,7 μ M.

En modalidades adicionales, la Secuenciación de la Generación Siguierte (NGS) puede utilizarse para la detección. Como describen

Brautigama *et al.*, 2010, el análisis de secuencia de ADN puede usarse para determinar la secuencia de nucleótidos del fragmento aislado y amplificado. Los fragmentos amplificados pueden aislarse y subclonarse en un vector y secuenciarse mediante el método de terminador de
5 cadena (que también recibe la denominación de secuenciación de Sanger) o secuenciación de terminación de terminador colorante. Por otra parte, el amplicón puede secuenciarse mediante la Secuenciación de Generación Siguiente. Las tecnologías NGS no requieren la etapa de la subclonación y las múltiples lecturas de secuenciación pueden
10 completarse en una única reacción. Tres plataformas de NGS, el Genome Sequencer FLX™ de 454 Life Sciences / Roche, el Illumina Genome Analyser™ de Solexa y el Applied Biosystems' SOLiD™ (abreviatura de: 'Sequencing by Oligobinding and Detection') se encuentran comercialmente disponibles. Por otra parte, se han
15 desarrollado actualmente dos métodos de secuenciación de moléculas únicas. Los mismos incluyen la Secuenciación de Molécula Única (tSMS) de Helicos Bioscience™ y la secuenciación de molécula única Real Time™ (SMRT) de Pacific Biosciences.

El Genome Sequencer FLX™ que comercializa por 454 Life
20 Sciences/Roche es un NGS de lectura larga, que usa PCR de emulsión y pirosecuenciación para generar lecturas de secuenciación. Pueden usarse fragmentos de ADN de 300–800 pb o bibliotecas que contienen fragmentos de 3–20 kb. Las reacciones pueden producir más de un millón de lecturas de aproximadamente 250 a 400 bases por corrida para
25 un rendimiento total de 250 a 400 megabases. Esta tecnología produce

las lecturas más largas pero la salida total de secuencias por corrida es baja en comparación con otras tecnologías de NGS.

El Illumina Genome Analyser™ que se comercializa por Solexa™ es un NGS de lectura corta que usa un secuenciación por enfoque de síntesis con nucleótidos terminadores reversibles etiquetados con colorante fluorescente y se basa en PCR de puente en fase sólida. Puede usarse la construcción de bibliotecas de secuenciación de extremos apareados que contienen fragmentos de ADN de hasta 10 kb. Las reacciones producen más de 100 millones de lecturas cortas que tienen una longitud de 35–76 bases de longitud. Estos datos pueden producir de 3–6 gigabases por corrida.

El sistema de secuenciación por Ligación y Detección de Oligos (SOLiD) comercializado por Applied Biosystems™ es una tecnología de lectura corta. Esta tecnología NGS usa ADN bicatenario fragmentado que tiene una longitud de hasta 10 kb. El sistema usa la secuenciación por ligación de cebadores oligonucleótidos etiquetados con colorante y PCR de emulsión para generar un billón de lecturas cortas que resulta en una salida de secuencias total de hasta 30 gigabases por corrida.

El tSMS de Helicos Bioscience™ y el SMRT de Pacific Biosciences™ aplican un enfoque diferente que usa moléculas de ADN únicas para las reacciones de secuencias. El sistema tSMS Helicos™ produce hasta 800 millones de lecturas cortas que resultan en 21 gigabases por corrida. Estas reacciones se completan mediante el uso de nucleótidos terminadores virtuales etiquetados con colorante fluorescente que se describen como un enfoque de “secuenciación por

síntesis”.

El sistema de Secuenciación de Generación Siguierte SMRT comercializado por Pacific Biosciences™ usa una secuenciación en tiempo real por síntesis. Esta tecnología puede producir lecturas de
5 hasta 1,000 pb como resultado de no estar limitado por terminador reversibles. Una salida de lecturas en bruto que es equivalente a una cobertura de una vez de un genoma humano diploide, y puede producirse por día mediante el uso de esta tecnología.

En otra modalidad, la detección puede completarse mediante el uso
10 de ensayos por transferencia de membrana que incluye transferencias por membrana de Western, transferencias por membrana de Northern y membranas de Southern. Tales ensayos de transferencia se usan comúnmente en la investigación biológica para identificación y cuantificación de muestras biológicas. Estos ensayos incluyen separar
15 primero los componentes de las muestras en geles mediante electroforesis, seguido por la transferencia de los componentes separados electroforéticamente desde los geles hasta membranas de transferencia que se elaboran de materiales tales como nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF) o nylon. Los analitos pueden
20 detectarse directamente sobre estos soportes o dirigirse a regiones específicas sobre los soportes mediante la aplicación de un vacío, acción capilar o presión, sin separación preliminar. Las membranas de transferencia se someten comúnmente a un tratamiento postransferencia para potenciar la capacidad de los analitos de diferenciarse entre sí y de
25 detectarse, ya sea visualmente sea o mediante lectores automatizados.

En otra modalidad la detección puede completarse mediante el uso de un ensayo ELISA, que usa un inmunoensayo de enzima en fase sólida para detectar la presencia de una sustancia, usualmente un antígeno, en una muestra líquida o en una muestra húmeda. Los antígenos de la muestra se fijan después a una superficie de una placa. Después, se aplica un anticuerpo específico adicional sobre la superficie de manera tal que puede ligarse al antígeno. Este anticuerpo se une a una enzima, y, en la etapa final, se añade una sustancia que contiene el sustrato de la enzima. La reacción posterior produce una señal detectable, más comúnmente un cambio de color en el sustrato.

Plantas transgénicas

En una modalidad, una planta, tejido de planta o célula de planta comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*. En una modalidad una planta, tejido de planta, o célula de planta comprende el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a una secuencia seleccionada entre la SEQID NO: 1. En una modalidad una planta, tejido de planta o célula de planta comprende el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a una secuencia seleccionada

entre la SEQ ID NO: 1. En otra modalidad, una planta, tejido de planta o célula de planta comprende la 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* consistente en una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO:3 o una secuencia que tiene

5 una identidad de secuencia de por lo menos el 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 3. En otra modalidad una planta, tejido de planta o célula de planta comprende la 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* consiste en una secuencia seleccionada entre

10 la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a una secuencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 3. En una modalidad, una planta, tejido de planta o célula de planta comprende un casete de expresión génica que comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1

15 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a una secuencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 1 que se une operativamente a un transgén no similar a metalotioneína de *Brachypodium distachyon*. En una modalidad, una planta, tejido de planta o célula de planta

20 comprende un casete de expresión génica que comprende una secuencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a una secuencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 1 que se une operativamente a un transgén no similar a metalotioneína de

25 *Brachypodium distachyon*. En una modalidad ilustrativa, una planta,

tejido de planta o célula de planta comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* que se une operativamente a un transgén, en donde el transgén puede ser un transgén de resistencia a insecticidas, un transgén de tolerancia a herbicidas, un transgén de eficiencia en el uso de nitrógeno, un transgén de eficiencia en el uso del agua, un transgén de calidad nutricional, un transgén de unión al ADN, un transgén de marcador seleccionable o combinaciones de éstos.

De acuerdo con una modalidad se proporciona una planta, tejido de planta o célula de planta, en donde la planta, tejido de planta o célula de planta comprende una secuencia promotora no endógena derivada del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unida operativamente a un transgén, en donde el promotor derivado de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* comprende una secuencia SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a la SEQ ID NO: 1. En una modalidad se proporciona una planta, tejido de planta o célula de planta en donde la planta, tejido de planta o célula de planta comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene por lo menos una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a la SEQ ID NO: 1 unida operativamente a un transgén similar al de metalotioneína de *Brachypodium distachyon*. En una modalidad se proporciona una planta, tejido de planta o célula de planta en donde la planta, tejido de planta o célula de planta comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del

80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a la SEQ ID NO: 1 unida operativamente a un transgén similar al de metalotioneína de *Brachypodium distachyon*. En una modalidad la planta, tejido de la planta, o célula de la planta es una planta dicotiledónea o monocotiledónea o una célula o tejido derivados de una planta dicotiledónea o monocotiledónea. En una modalidad la planta se selecciona del grupo consistente en maíz, trigo, arroz, sorgo, avena, centeno, banana, caña de azúcar, frijol de soya, algodón, girasol, y canola. En una modalidad la planta es *Zea mays*. De acuerdo con una modalidad la planta, tejido de planta o célula de planta comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a la SEQ ID NO: 1 unida operativamente a un transgén similar al de metalotioneína de *Brachypodium distachyon*. En una modalidad la planta es *Zea mays*. De acuerdo con una modalidad la planta, tejido de planta o célula de planta comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene por lo menos una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con la SEQ ID NO: 1 unida operativamente a un transgén no similar al de metalotioneína de *Brachypodium distachyon*. En una modalidad la planta, tejido de planta o célula de planta comprende un promotor unido operativamente a un transgén en donde el promotor consiste en la SEQ ID NO: 1 o en una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a la SEQ ID NO: 1. En una modalidad la planta, tejido de planta o célula de planta comprende un promotor unido operativamente a un transgén en donde el promotor

consiste en la SEQ ID NO: 1 o en una secuencia que tiene por lo menos una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a la SEQ ID NO:1. De acuerdo con una modalidad el constructo génico que comprende la secuencia promotora derivada similar al de metalotioneína de *Brachypodium distachyon* unida operativamente a un transgén se incorpora en el genoma de la planta, tejido de planta o célula de planta.

En una modalidad se proporciona una planta, tejido de planta o célula de planta no *Brachypodium* que comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene por lo menos una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a la SEQ ID NO: 1, unida operativamente a un transgén. En una modalidad se proporciona una planta, tejido de planta, o célula de planta no *Brachypodium*, que comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a la SEQ ID NO: 1, unida operativamente a un transgén. De acuerdo con una modalidad la planta, tejido de planta o célula de planta no *Brachypodium* es una planta, célula de planta o tejido de planta monocotiledónea o dicotiledónea derivadas de una planta monocotiledónea o dicotiledónea.

En una modalidad la planta se selecciona del grupo consistente en maíz, trigo, arroz, sorgo, avena, centeno, bananas, caña de azúcar, frijol de soya, algodón, girasol y canola. En una modalidad la planta es *Zea mays*. De acuerdo con una modalidad la secuencia promotora unida operativamente a un transgén se incorpora en el genoma de la planta, tejido de planta o célula de planta.

En una modalidad se proporciona una planta, tejido de planta o célula de planta no Brachypodium que comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene por lo menos una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a la SEQ ID NO: 1, unida
 5 operativamente al extremo 5' de un transgén y una secuencia 3' no traducida que comprende la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene por lo menos una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a la SEQ ID NO: 3, en donde la secuencia 3' no traducida se une operativamente a dicho transgén. De acuerdo con una
 10 modalidad la planta, tejido de planta o célula de planta no Brachypodium es una planta dicotiledónea o monocotiledónea o es un tejido de planta o célula derivada de una planta dicotiledónea o monocotiledónea. En una modalidad la planta se selecciona del grupo consistente en maíz, trigo, arroz, sorgo, avena, centeno, bananas, caña de azúcar, frijol de
 15 soya, algodón, girasol y canola. En una modalidad la planta es *Zea mays*. De acuerdo con una modalidad la secuencia promotora unida operativamente a un transgén se incorpora en el genoma de la planta, tejido de planta o célula de planta.

En una modalidad, una planta, tejido de planta o célula de planta
 20 de acuerdo con los métodos derivados en la presente puede ser una planta monocotiledónea. La planta, tejido de planta o célula de planta monocotiledóneas puede ser sin limitación maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, cebada, sorgo, orquídeas, bambú, banana, anea, lilas, avena, cebolla, mijo, césped común, césped, y triticales.

25 En una modalidad, una planta, tejido de planta o célula de planta

de acuerdo con los métodos divulgados en la presente pueden ser una planta dicotiledónea. La planta, tejido de planta, o célula de planta dicotiledónea, puede ser sin limitación alfalfa, colza, canola, mostaza india, mostaza etíope, soja, girasol, algodón, garbanzos, brócoli, lechuga, coliflor, apio, pepino, berenjena, lechuga, melones, duraznos, pimienta, maní, papa, calabaza, rábanos, espinacas, remolacha azucarera, tabaco, tomate y sandía.

Un experto en la materia reconocerá que después de haberse incorporado la secuencia exógena establemente en plantas transgénicas y de haberse confirmado que es operable, puede introducirse en otras plantas mediante el cruce sexual. Puede usarse cualquier cantidad de técnicas de cultivos selectivo standard, en función de la especie a cruzar.

La presente descripción también abarca semillas de las plantas transgénicas descritas anteriormente, en donde la semilla tiene el transgén o constructo génico que contiene los elementos reguladores del gen de la presente descripción. La presente revelación abarca además la progenie, clones, líneas celulares o células de las plantas transgénicas descritas anteriormente en donde dicha progenie, clon, línea celular o célula tiene el transgén o constructo génico que contiene los elementos reguladores del gen de la presente descripción.

La presente descripción también abarca el cultivo de las plantas transgénicas descritas anteriormente, en donde la planta transgénica tiene el transgén o constructo de gen que contiene los elementos reguladores de los genes de la presente descripción. Por lo tanto, tales

plantas transgénicas pueden diseñarse mediante ingeniería genética para tener, entre otros, uno o más rasgos o eventos transgénicos que contienen los elementos reguladores de los genes de la presente descripción, mediante su transformación con moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, y pueden cultivarse mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica.

Método para expresar un transgén

En una modalidad, un método para expresar por lo menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unido operativamente a por lo menos una secuencia de transgén o de policonector. En una modalidad, un método para expresar por lo menos un transgén en una planta que comprende cultivar una planta que comprende una 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unido operativamente a por lo menos una secuencia de transgén o un policonector. En una modalidad el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* consiste en una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a una secuencia seleccionada entre la SEQID NO: 1. En otra modalidad la 3'-UTR del gen similar a metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* consiste en una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80%, 85%, 90%,

95% o 99,5% con respecto a una secuencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 3. En una modalidad, un método para expresar por lo menos un transgén en una planta que comprende cultivar una planta que comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* y una 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unido operativamente a por lo menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar por lo menos un transgén en un tejido de planta o célula de planta que comprende cultivar un tejido de planta o célula de planta que comprende un promotor unido operativamente a por lo menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar por lo menos un transgén en un tejido de planta o célula de planta que comprende cultivar un tejido de planta o célula de planta que comprende una 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unido operativamente a por lo menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar por lo menos un transgén en un tejido de planta o célula de planta que comprende cultivar un tejido de planta o célula de planta que comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* y una 3'-UTR del gen similar a metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unido operativamente a por lo menos un transgén.

En una modalidad, un método para expresar por lo menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unido

operativamente a por lo menos un transgén. En una modalidad el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* consiste en una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1. En una modalidad el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* consiste en una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1. En otra modalidad la 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* consiste en una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos el 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 3. En otra modalidad la 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* consiste en una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que tiene una identidad de secuencia del 80%, 85%, 90%, 95% o 99,5% con respecto a una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 3. En una modalidad, un método para expresar por lo menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un casete de expresión génica que comprende un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* y una 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unido operativamente a por lo menos un

transgén. En una modalidad, un método para expresar por lo menos un transgén en una planta comprende cultivar una planta que comprende un casete de expresión génica que comprende una 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unido
5 operativamente a por lo menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar por lo menos un transgén en un tejido de planta o célula de planta comprende cultivar un tejido de planta o célula de planta que comprende un casete de expresión génica que contiene un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium*
10 *distachyon* unido operativamente a por lo menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar por lo menos un transgén en un tejido de planta o célula de planta comprende cultivar un tejido de planta o célula de planta que comprende un casete de expresión génica que contiene la 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de
15 *Brachypodium distachyon* unido operativamente a por lo menos un transgén. En una modalidad, un método para expresar por lo menos un transgén en un tejido de planta o célula de planta comprende cultivar un tejido de planta o célula de planta que comprende un casete de expresión génica, un promotor de un gen similar al de metalotioneína
20 (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* y una 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* unido operativamente a por lo menos un transgén.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características y/o modalidades particulares. Los ejemplos no deberían
25 construirse para limitar la a las características o modalidades

particulares ejemplificadas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Un promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* (*mtl*)

El promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* (SEQ ID NO: 1) es una secuencia de polinucleótidos de 2,000 pb que se identificó de la secuencia de ADN genómico (gADN) de *Brachypodium distachyon*. La secuencia promotora se identificó mediante la búsqueda en la base de datos BLAST de Phytozomas (Goodstein *et al.*, 2012) con un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Zea mays*. Los aciertos resultantes se analizaron y se seleccionó una única secuencia codificante para análisis adicional. En base a la evaluación de la secuencia cromosómica contigua que abarcaba millones de pares de bases, se identificó una secuencia de polinucleótidos de 2,000 pb y se aisló para su uso en la expresión de secuencias codificantes heterólogas. Esta novedosa secuencia de polinucleótidos se analizó para su uso como una secuencia reguladora para impulsar la expresión de un gen. Como se muestra en la secuencia (SEQ ID NO: 2) más adelante, el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de 2,000 pb de la SEQ ID NO: 1 se proporciona como pares de base 1 – 2,000. La secuencia codificante del gen *mtl* nativo de la SEQ ID NO: 6 se proporciona como pares de base 2,001 – 2,345. La 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de 1,002 pb de la SEQ

ID NO: 3 se proporciona como pares de base 2,346 – 3,347. Por lo tanto, la SEQ ID NO: 2 se proporciona como sigue:

```

tttcgtgtgcttacttggggcttcctttgggcctgcggaagcagacggcgtgccagctgagaccgttgg
ggacaatgtggatggacgtctagcttcgtggaaggcccttctcctttccaagggaggatgactggtgct
5 ggtcaagtcaccctgacagcgatgccggtctactcgatgatgtcactcgaccttcggacaagatca
tcaaaggggtggacaagatctgtcgtggttcttggcggtggcagaaggacgctaaagggggggg
ggcattgtatgggtggcttgggtcgtggtgtgttcgccgaagccttcggtggactcggaattccaaatctt
cgcatgctcaacgaggccttgagggtccgctagagggtggcttgagaggggtggacgattccaaacct
gggtcggtttcaagggtgagacgcccagaggtctatgttatctttgaggcggccacttcctctttggtgg
10 gcgatggccggaagaccctctctggaccgatcgttggctgcatggcgtctgttttcgagatgcgttcct
gatcctcgtgggcatgtttgccacaagttttgcgcacgcgcacagtgcgggaggctctgcatggag
cgtggactggcgacatgggtccagacctaaggggaagctactcttgaggagttcctcactctctggga
ctggcttcgtgggtccaactggaagaaggaggggccgactctcttcattggaactggtctcgtggtg
atagttactcggcaaagactgcttatgcgaatctcttcactggccgcatggttgaccggttagcggctg
15 agatctagggcttcggagagggtgctgtttcttcgtctggctcgcagttcgaaatagatgctagacggcg
gatcgttgcgaggcgtgggcttccccaccctgacaagtgtcaggagatggagaccatttcccatcta
ctcttggggtgtgtcttggcgaggcaggtttgggagcgcttggtggcggttggggacacgtggagtg
ggctccgaatgcggatgctactctgcgggaatggtggtcttctctcccttaccacggcgagcccgga
gggacttccggacggggatcatacttgttcttggaccatttgggtgccattggaatgatgtggccttcctt
20 gcagcttgctgtgcttcgcctccaggaggagtttggtcggtgggcgacgcggcctctttaggggta
gagtgtctattccagccttgatggtgagtggttggatagctagcacatagcttttttctcttcttgccact
tggtgatgttgattgccgcttcggcgttgtagccttctggctcttcttatttaacgatgatgcacccg
ctgggtggcattcttgaaatTTTTGAGAAAatactcctacaaaggaagtacagtaatttgatacacia
tgctttctctaaatacgaaaatacaaacatcctaagtattccaactatgctactccctccgttcctaaa
25 ctcttatcttgtttttgttcaaatttgtaccaaacacgacaaaaatttagtaacggaggaagtatatata

```

cgaagtgatacceaataaggtgtttctttacttgaaagctagttcctctgaggtaaaagaaatgatgag
 gatcaaggaaggcccatttcttgccggcacgcagttgccgaagtcagtagatttaaatgacctcaca
 tactgaagaaggaaagggaagtaaccacgccattgttgcttttagcagaaagcaaccatatcctaatt
 aacatcacagtacacggtgaaacggcagggcacgataattggtgaagactgattccagggagcatc
 5 gtggcacgcaaaaacgcccttgccctgttcccttataaatagtgggtgcagaagatacatttgtgatcac
 catctcaaagcgcctctttattcccccttcatcttgagcttaagtactagagaaaaattaaggatgtcttg
 cagctgtggatctggatgcagctgcggctcaaactgcacctgcgggtatgtatagatgcttaattctgtg
 ttgcagattactacgtagctgctaataccatctaagtaatgacaatgctttctcatgatgatcaattttcat
 ttgctgtgtggttcagcaagatgtaccctgacttggcagagaagagcggcggcaccagcaggcca
 10 ccaccatgatcctcggcggttgccctgctaaggcccagtttgaggaggccgcccagagtcgggtgaggc
 cggccatggctgcagctgcggcgccaactgcaagtgcgacccgtgcaactgctaagatgcacgcg
 acgcgctgctgcttgtggtgtgtgtttgtgtgatctcgactgaataaaagggacacggtacatccgggg
 ttggttggtgctcgagtcgagtgcaaggtgtgtggttgccagctcttggtgtgtgtctccttgtgtc
 tgtgacttgtgaaaccattaatagtaaccactttgtgcttgtgtgtgtgtgggcacctgtgttctgtaatgg
 15 tctatctggagtgaatataacaagacaggtttgcctaaccatgccttttcttctttagggtcatcgcg
 caacacgaatgacgagaaccaatgatcttaggactatcaaatagacaataaactcagcatggagc
 aatgtactgctaataacggctcctaataacacagttgggaagcagtaatcgatggaaaacacttcct
 cagttcagaagggaacatgtagatgggaaagtaaacaggatatatagacacatgcagttagggtcta
 ccacaagaagacatgccacaggactaaaaacagaagctggggttggaacaacttatgcagacgct
 20 agctatccagataaaccttagagaaacagctatgagaataagcgtctgaaattttagttgcctgtttg
 gaatggcttatggacgacaagcttattttctggagtagcctacaagtacaagccaaggcacatgctgtt
 ccaaactggcccatattttgcacaaccaaaggaaaagagacagtgacataagagcatctccagtga
 ttcagtgagataccccaagtcaccaaagtccggttcggccgaaatggacatgctggccagaaaa
 acatctcccaatgggttaccccaaatagataattttgtatgtttgtccggcccaatccccaacatctcct
 25 aaatttggggcaactttgcgggtgtccagtggtccggtgtccgggcccacttcttttctcccaagcgagca

tcttctcccgaagcacgaagccccgctc

Ejemplo 2: Construcción de vectores

Se construyeron los siguientes vectores para incorporar el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* corriente arriba de un transgén. El constructo de vector pDAB120419 contenía un casete de expresión génica, en el que el transgén *phi-yfp* (proteína fluorescente amarilla Phi); Clontech, Mountain View, CA) se impulsó por el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 1 y se flanqueó por la 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 3. En la Figura 1 se muestra un diagrama de este casete de expresión génica, y se proporciona como SEQ ID NO: 4. El vector también contenía un casete de expresión génica de marcador seleccionable que contenía el transgén *aad-1* (patente de los EE.UU. núm. 7,838,733) impulsado por el promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays* (Christensen *et al.*, (1992) *Plant Molecular Biology* 18; 675-689) y se terminó por la 3'-UTR de Lipasa de *Zea mays* (patente de los EE.UU. núm. 7,179,902). En la Figura 1 se muestra un casete de expresión génica y se proporciona como la SEQ ID NO: 5. Este constructo se construyó mediante la síntesis del promotor recién diseñado de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* por un proveedor externo (Geneart via Life Technologies, Carlsbad, CA) y la clonación del promotor en un vector dador Gateway™ (Life Technologies) mediante el uso del Kit de Clonación y Ensamblaje

GeneArt® Seamless (Life technologies) y enzimas de restricción. El vector dador resultante se integró en un vector de destino binario final mediante el uso del sistema de clonación Gateway™ (Life Technologies). Se obtuvieron clones de pDAB120419 y se confirmaron a través de la digestión por enzimas de restricción y secuenciación. El constructo resultante contenía un promotor que podía impulsar fuertemente la expresión de transgenes que estaban unidos operativamente al extremo 3' del promotor.

10 **Ejemplo 3: Elementos reguladores modificados del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon***

El promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de 2,000 pb de la SEQ ID NO: 1 se modificó mediante alteraciones en la secuencia promotora. Se diseñó una variante y se proporcionó como la SEQ ID NO: 12. En la Figura 3 se proporciona un alineamiento que compara el promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 1 y el promotor modificado de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 12. Como se muestra en la Figura 3 las secuencias promotoras de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 12 comparten una identidad de secuencia del 97,2%. En la presente se proporcionan nuevas secuencias promotoras que se origina de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de los promotores de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 1. En una modalidad, la

novedosa secuencia de polinucleótidos de promotores de la SEQ ID NO: 12 pueden usarse en un casete de expresión génica para impulsar la expresión de transgenes. En otro aspecto de esta modalidad, la novedosa secuencia de polinucleótidos de promotores de la SEQ ID NO: 12 puede unirse operativamente a un gene de interés y flanqueado por un 3'-UTR, por ejemplo la 3'-UTR de la SEQ ID NO: 3, y pueden usarse en un casete de expresión génica para impulsar la expresión de transgenes.

La 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de 1,002 pb de la SEQ ID NO: 3 se modificó mediante la introducción de alteraciones en la secuencia de 3'-UTR. Se diseñaron nuevas variantes y se proporciona como SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18. En la Figura 5 se proporciona una alineación que compara el 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* modificado de la SEQ ID NO: 3 y las 3'-UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* modificadas de la SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18. Como se muestra en la Figura 5 las secuencias de polinucleótidos de 3'-UTR de la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 17 comparten una identidad del 94,2%. En la Figura 5 se ilustran las secuencias de polinucleótidos de 3'-UTR de la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 18 que comparten una identidad de secuencia del 97,5%. Finalmente, en la Figura 5 se presentan las secuencias de polinucleótidos de 3'-UTR de la SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 17 que comparten una identidad de secuencia del 92,7%. En la presente se proporciona una novedosa secuencia de 3'-UTR que se originó de la 3'-

UTR del gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* de la SEQ ID NO: 3. En una modalidad, la novedosa secuencia de 3'-UTR de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 17 puede usarse en un casete de expresión génica para terminar la expresión de transgenes. En otro aspecto de esta modalidad, la novedosa secuencia de 3'-UTR de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 17 puede unirse operativamente a un transgén impulsado por un promotor, por ejemplo el promotor de la SEQ ID NO: 1 y puede usarse en un casete de expresión génica para impulsar la expresión de transgenes. En otra modalidad, la novedosa secuencia 3'-UTR de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 18 puede usarse en un casete de expresión génica para terminar la expresión de transgenes. En otro aspecto de esta modalidad, la novedosa secuencia 3'-UTR de polinucleótidos de la SEQ ID NO: 18 puede unirse operativamente a un transgén impulsado por un promotor, por ejemplo el promotor de la SEQ ID NO: 1 y puede usarse en un casete de expresión génica para impulsar la expresión de transgenes.

Ejemplo 4: Transformación del maíz

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*:

El vector de expresión binario se transformó en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* DAt13192 (cepa ternaria deficiente de RecA) (publicación de patente internacional núm. WO2012016222). Se seleccionaron colonias bacterianas, y el ADN de plásmido binario se aisló y se confirmó mediante la digestión con enzimas de restricción.

Iniciación del cultivo de *Agrobacterium*:

Unos cultivos de *Agrobacterium* se aplicaron a partir de existencias de glicerol en medio mínimo AB (Gelvin, S., 2006, *Agrobacterium Virulencia de Gene Inducción*, en Wang, K., ed, *Agrobacterium Protocols*
 5 *Second Edition Vol 1*, Humana Press, p 79; preparado sin sacarosa y con 5 g/L de glucosa y 15 g/L de Bacto™ Agar) y se incubó a 20 °C en la oscuridad durante 3 días. Los cultivos de *Agrobacterium* se aplicaron después en una placa de medio YEP (Gelvin, S., 2006, *Agrobacterium Virulence Gene Inducción*, en Wang, K., ed., *Agrobacterium Protocols*
 10 *Second Edición Vol. 1*, Humana Press, p. 79) y se incubó a 20 °C en la oscuridad durante 1 día.

En el día de un experimento, se preparó en un volumen adecuado para la magnitud del experimento una mezcla de medio de inoculación (2,2 g/L de sales de MS, 68,4 g/L de sacarosa, 36 g/L de glucosa, 115
 15 mg/L de L-prolina, 2 mg/L de glicina, 100 mg/L de L mio-inositol, 0,05 mg/L de ácido nicotínico, 0,5 mg/L de piridoxina HCl, 0,5 mg/L de tiamina HCl) y acetosiringona. Una solución 1 M de stock de acetosiringona en 100% de sulfóxido de dimetilo se añadió al medio de inoculación para preparar una concentración final de acetosiringona de
 20 200 mM.

Para cada constructo, 1-2 bucles de *Agrobacterium* de la placa de YEP se suspendieron en 15 ml de la mezcla de medio de inoculación/acetosiringona dentro de un tubo de centrifugadora estéril, descartable, de 50 ml, y se midió la densidad óptica de la solución a 600
 25 nm (OD₆₀₀) en un espectrofotómetro. La suspensión se diluyó después a

0,25-0,35 de OD₆₀₀ mediante el uso de la mezcla adicional de medio de inoculación/acetosiringona. El tubo de suspensión de *Agrobacterium* se colocó después en posición horizontal en un agitador de plataforma ajustado a aproximadamente a 75 rpm a temperatura ambiente durante
 5 entre 1 a 4 horas antes de su uso.

Transformación del maíz:

Los constructos experimentales se transformaron en maíz a través de transformación mediada por *Agrobacterium* de embriones inmaduros
 10 aislados a partir de la línea endogámica, Zea mays cv B104. El método usado es similar a los publicadas por Ishida et al, (1996) Nature Biotechnol 14: 745-750 y Frame et al., (2006) Plant Cell Rep 25: 1024-1034, pero con varias modificaciones y mejoras para hacer que el método sea adaptable a una transformación de alto rendimiento. Un
 15 ejemplo de un método usado para producir un número de eventos transgénicos en el maíz puede encontrarse en la patente de los EE.UU. núm. 2013/0157369 A1, que comienza con las etapas de infección del embrión y cocultivo.

Unas plántulas transgénicas putativas T₀ se trasplantaron desde
 20 Phytatrays™ (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) a pequeños pots de material plástico de 3,5" (T. O. Plastics; Clearwater, MN) llenos con medio de cultivo (Premix BX; Premier Tech Horticulture), recubierto con humidomas (Arco Plastics Ltd.) y después se templó en una sala de cultivo (28°C día/24°C noche, fotoperíodo de 16 horas, 50-70% de
 25 humedad relativa, intensidad de luz 200 µEm-2 sec-1). Cuando las

plantas alcanzaron la etapa de desarrollo V3-V4 (3 o 4 collares de hojas visibles), se trasplantaron en una mezcla de suelo Sunshine Custom Blend 160 y cultivadas hasta floración en el invernadero (Tipo de exposición a la luz: foto o asimilación; límite de luz elevado: 1200 PAR; longitud diurna 16 horas; 37°C día/24°C noche). Las plantas se analizaron para establecer el número de copias de transgenes mediante ensayos qPCR para lo cual se usaron cebadores diseñados para detectar números relativos de copias y eventos de copias simples putativos seleccionados para el progreso, se trasplantaron en macetas de 5 galones.

Ejemplo 5: Confirmación molecular del número de copias

La integración estable del transgén *phi-yfp* dentro del genoma de las plantas transgénicas de *Z. mays* se confirmó a través de un ensayo de sonda de hidrólisis. Las plántulas transgénicas de *Z. mays* transformadas de forma estable que se desarrollaron de los callos se obtuvieron y analizaron para identificar eventos que contenían un número de copias bajo (1-2 copias) de insertos de cadena T de longitud total. Las plántulas identificadas se mandaron al invernadero y se cultivaron.

El sistema Roche Light Cycler480™ se usó para determinar el número de copias de transgenes. El método usó una reacción biplex TaqMan® que empleaba oligonucleótidos específicos del gen *phi-yfp* y del gen de referencia endógeno de *Z. mays*, *invertasa* (número de acceso a Genbank: U16123.1), en un único ensayo. Se determinaron el

número de copia y la cigosidad midiendo la intensidad de fluorescencia específica de *phi-yfp*, respecto de la fluorescencia específica de *invertasa*, en comparación con los estándares conocidos del número de copias.

- 5 Se amplificó un fragmento de ADN específico del gen *phi-yfp* con un conjunto de cebador/sonda TaqMan® que contenía una sonda marcada con colorante fluorescente FAM™ y la *invertasa* se amplificó con un segundo conjunto de cebador/sonda TaqMan® con contenido de una sonda marcada con fluorescencia HEX™. Se determinaron el número de
- 10 copias y la cigosidad de las muestras midiendo la intensidad relativa de fluorescencia específica del gen reportero, *phi-yfp*, para la fluorescencia específica del gen de referencia, *invertasa*, en comparación con los estándares conocidos del número de copias.

15 **Ejemplo 6: Confirmación molecular de la expresión de la proteína**

Extracción de la proteína:

- Se usaron placas Nunc® Maxi-Sorp de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) para ELISA. Las placas se recubrieron con anticuerpo monoclonal murino de captura anti-Phi-YFP (OriGene
- 20 Technologies Inc., Rockville, MD). El anticuerpo se diluyó en PBS (1 µg/mL) y se añadieron 150 µL de PBS diluido por pocillo. Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20-30 minutos antes de lavar 4x con 350 µL de amortiguador de lavado [1x PBS suplementado con 0,05% de
- 25 Tween®-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)]. A continuación, las placas

se bloquearon con 200 μ L por pocillo de amortiguador de bloqueo [1x PBS suplementado con 0,05% de Tween[®]-20 más 0,5% de BSA (Millipore Probumin[®])] durante un mínimo de 1 hr a +37 °C seguido de 4x lavados con 350 μ L de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash[™] 2, Tomtec, Inc., Hamden, CT).

Para el ELISA de Phi-YFP, se usó Phi-YFP Evrogen recombinante 1 mg/mL (Axxora LLC, Farmingdale, NY) como un estándar. Se usó una curva estándar de ajuste de 5 parámetros (entre 1 ng/ml y 0,125 ng/ml de estándares) para asegurar que todos los datos entren en la porción lineal de la curva. A continuación, se añadieron 100 μ L de estándar o muestra al pocillo. Se usó una dilución mínima 1:4 de muestra en el amortiguador de ensayo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas (250 rpm; agitador de placas de titulación) seguido de 4x lavados con 350 μ L de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash[™] 2). Se añadieron aproximadamente 100 μ L de 1 μ g/mL de anticuerpo primario anti-PhiYFP policlonal de conejo Evrogen (Axxora) a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hr a temperatura ambiente en un agitador de placas a 250 rpm seguido por 4x lavados con 350 μ L de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash[™] 2). A continuación, 100 μ L de anticuerpo secundario HRP de IgG anticonejo (Thermo Scientific) se diluyeron 1:5000 en amortiguador de bloqueo/de ensayo, que se añadió a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hr a temperatura ambiente en un agitador de placas a 250 rpm seguido por 4x lavados con 350 μ L de amortiguador de lavado (Tomtec QuadraWash[™] 2). A continuación, 100 μ L de sustrato

Pierce 1 Step Ultra TMB ELISA (Thermo Scientific) se añadió al pocillo con moderada agitación durante 10 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 50 µL de H₂SO₄ 0,4 N. La absorbancia se leyó a 450 nm con un filtro de referencia de 650 nm.

5 Los niveles de expresión de Phi-YFP se determinaron mediante ELISA usando los kit de Acadia BioSciences (Portland, ME). Los ensayos de ELISA se realizaron mediante el uso de múltiples diluciones de los extractos y mediante los reactivos y las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Los niveles de proteína se
10 normalizaron mediante el uso del ensayo de proteínas solubles totales, realizados mediante el uso del reactivo de ensayo de proteínas de 660 nm proporcionado por Thermo Scientific y según las instrucciones del proveedor.

15 **Ejemplo 7: Expresión de genes unidos operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon***

Las plantas de maíz se transformaron con un constructo de expresión génica que contenía el promotor de un gen similar al de
20 metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* como se describió anteriormente. El análisis por ELISA confirmó que el novedoso promotor impulsó una expresión fuerte de un transgén. Las mediciones cuantitativas de la proteína Phi-YFP obtenidas a partir de plantas transgénicas que comprenden los novedosos constructos de promotor se
25 muestran en la TABLA 1. Los datos muestran que la proteína Phi-YFP en

las plantas que contienen el novedoso promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* (es decir, pDAB120419) se expresa de manera preferible con mayor intensidad en el tejido de las raíces que en el tejido de las hojas.

5 **TABLA 1:** Expresión T₀ del promotor *MTL* de *B. distachyon*, de Phi-YFP y AAD1

	Construeto	Evento	PhiYFP(ng/mg)		AAD1(ng/mg)	
			Hoja	Raíz	Hoja	Raíz
10	120419	120419[1]-002.001	3	ND	107	ND
	120419	120419[1]-003.001	3	ND	116	ND
	120419	120419[1]-005.001	3	ND	392	ND
	120419	120419[1]-007.001	3	22	149	129
	120419	120419[1]-010.001	3	ND	110	ND
	120419	120419[1]-011.001	3	55	111	62
	120419	120419[1]-014.001	3	ND	162	ND
15	120419	120419[1]-017.001	3	ND	324	ND
	120419	120419[1]-018.001	3	607	412	372
	120419	120419[1]-023.001	3	ND	103	ND
	120419	120419[1]-024.001	3	ND	107	ND
	120419	120419[1]-026.001	3	346	289	147
	120419	120419[1]-027.001	3	234	415	177
	120419	120419[1]-031.001	3	41	900	233
20	120419	120419[1]-032.001	3	ND	175	ND
	120419	120419[1]-033.001	3	ND	313	ND
	120419	120419[1]-035.001	3	79	651	210

ND- No se determinó

Las plantas copia transgénicas únicas T₀ que contienen un evento transgénico pDAB120419 establemente expresado se retrocruzaron con
 25 plantas de maíz de tipo salvaje B104 para obtener semillas que se

cultivaron hasta obtener plantas maduras. A partir de estas plantas maduras, se usaron plantas T_1 homocigotos para análisis a efectos de determinar la expresión de la proteína AAD1 y Phi-YFP. Se usaron cinco elementos por constructo y diez plantas por evento para el análisis de la

5 expresión de la proteína. Se usaron tres eventos por constructo y de tres a cinco plantas por evento para la expresión en otros tipos de tejidos. Se efectuó el análisis de cigosidad para Phi-YFP y AAD1. Las mediciones cuantitativas por ELISA de las proteínas Phi-YFP y AAD1 obtenidas a partir de diferentes tipos de tejido que incluían tejidos de

10 hojas, mazorca, Cáscara, polen, raíz, estigma y tallos de plantas transgénicas T_1 que comprenden novedosos constructos promotores se muestran en la TABLA 2. Los datos confirmaron los resultados de la expresión en las hojas T_0 y además demostraron que se obtuvo una expresión elevada constante de proteína Phi-YFP primariamente en los

15 tipos de tejidos de raíces de las plantas que contenían el novedoso promotor (pDAB120419). Estos datos demuestran que el novedoso promotor ilustrado en la presente impulsa la expresión preferencial en las plantas y que este perfil de expresión es heredable desde una primera generación a una segunda generación. Por lo tanto, el promotor

20 de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* es útil para aplicaciones biotecnológicas.

TABLA 2: Expresión de proteína en diferentes tipos de tejidos de plantas de maíz transgénicas

	Constructo	Eventos	Tejido	Valor medio de (Phi-YFP ng/mg)	Valor medio de (AAD1 ng/mg)
5	120419	120419[1]-002	Hoja V4	0,3	34,5
	120419	120419[1]-002	Raíz V4	608,7	2419,7
	120419	120419[1]-014	Hoja V4	0,0	32,4
	120419	120419[1]-014	Raíz V4	418,0	2375,7
10	120419	120419[1]-023	Mazorca R3	0,0	2794,7
	120419	120419[1]-023	Cáscara R3	0,0	4495,0
	120419	120419[1]-023	Hoja R3	47,4	1387,0
	120419	120419[1]-023	Hoja V12	0,0	188,3
	120419	120419[1]-023	Hoja V4	0,1	30,3
15	120419	120419[1]-023	Polen R3	0,0	1003,7
	120419	120419[1]-023	Raíz R3	0,0	355,0
	120419	120419[1]-023	Raíz V4	274,3	1536,0
	120419	120419[1]-023	Estigma R3	0,7	4515,0
	120419	120419[1]-023	Tallo R3	1,7	6545,7
20	120419	120419[1]-024	Mazorca R3	0,0	3615,7
	120419	120419[1]-024	Cáscara R3	0,0	4998,3
	120419	120419[1]-024	Grano R ³	0,0	2100,0
	120419	120419[1]-024	Hoja R3	3,2	1498,2

TABLA 2 Continuación				
120419	120419[1]-024	Hoja V12	0,0	240,3
120419	120419[1]-024	Hoja V4	0,9	38,8
120419	120419[1]-024	Polen R ³	0,0	4313,0
120419	120419[1]-024	Raíz R3	0,0	964,7
120419	120419[1]-024	Raíz V4	132,0	1001,0
120419	120419[1]-024	Estigma R3	0,3	7784,3
120419	120419[1]-024	Tallo R3	0,0	5991,0
120419	120419[1]-033	Mazorca R3	0,0	4212,7
120419	120419[1]-033	Cáscara R3	0,0	5691,0
120419	120419[1]-033	Grano R3	0,0	1804,0
120419	120419[1]-033	Hoja R3	0,3	1463,5
120419	120419[1]-033	Hoja V12	0,0	398,4
120419	120419[1]-033	Hoja V4	0,6	30,7
120419	120419[1]-033	Polen R3	0,0	3759,3
120419	120419[1]-033	Raíz R3	0,0	1461,0
120419	120419[1]-033	Raíz V4	787,3	3445,0
120419	120419[1]-033	Estigma R3	0,0	7656,3
120419	120419[1]-033	Tallo R3	0,0	6670,0

Los resultados de ELISA de Phi-YFP indican que el elemento regulador del promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* SEQ ID NO:1) impulsó una expresión preferida en las partes subterráneas, específicamente en los tejidos de la raíz, de

Phi-YFP en los eventos T_0 que se transformaron con el constructo, pDAB120419. Se observó una expresión desdeñable de Phi-YFP por elemento regulador de promotor de un gen similar a metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* en los tejidos de hoja de estos eventos (TABLA 1 y TABLA 2). Los eventos producidos a partir de la transformación también expresaron la proteína AAD1 tanto en los tejidos de las hojas como de las raíces. La expresión de AAD1 dentro de estos eventos sirvió como un control para comparar los niveles de expresión de Phi-YFP en diferentes tejidos. En resumen, el promotor de un gen similar a metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* se desarrolló para una expresión fuerte de un transgén dentro de los tejidos subterráneos en especies de plantas tales como el maíz.

Ejemplo 8: Transformación en plantas de cultivo, de genes unidos operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*

El frijol de soya puede transformarse con genes unidos operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* mediante el uso de las mismas técnicas anteriormente descritas en el Ejemplo #11 o Ejemplo #13 de la Solicitud de patente WO 2007/053482.

El algodón puede transformarse con genes unidos operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* mediante el uso de las mismas técnicas anteriormente descritas en el Ejemplo #14 de la patente de los EE.UU.

núm. 7,838,733 o en el Ejemplo #12 de la Solicitud de patente WO 2007/053482 (Wright *et al.*).

La canola puede transformarse con genes unidos operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* mediante el uso de las mismas técnicas anteriormente descritas en el Ejemplo #26 de la patente de los EE.UU. núm. 7,838,733 o en el Ejemplo #22 de la Solicitud de patente WO 2007/053482 (Wright *et al.*).

El trigo puede transformarse con genes unidos operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* mediante el uso de las mismas técnicas anteriormente descritas en el Ejemplo #23 de la Solicitud de patente WO 2013/116700A1 (Lira *et al.*).

El arroz puede transformarse con genes unidos operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* mediante el uso de las mismas técnicas anteriormente descritas en el Ejemplo #19 de la Solicitud de patente WO 2013/116700A1 (Lira *et al.*).

Ejemplo 9: Transformación mediada por *Agrobacterium* de genes unidos operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* (*mtl*)

A la luz de la presente descripción, es posible transformar plantas de cultivo adicionales de acuerdo con modalidades de la presente descripción mediante el uso de técnicas que se conocen en la técnica.

Para la transformación mediada por *Agrobacterium*, de centeno, véase, por ejemplo, Popelka JC, Xu J, Altpeter F., "Generation of rye with low transgene copy number after biolistic gene transfer and production of (*Secale cereale* L.) plants instantly marker-free transgenic rye", Transgenic Res. 2003 Oct; 12(5):587-96.). Para la transformación mediada por *Agrobacterium*, del sorgo, ver, por ejemplo, Zhao *et al.*, "*Agrobacterium*-mediated sorghum transformation" Plant Mol Biol. 2000 Dec; 44(6):789-98. Para la transformación mediada por *Agrobacterium*, de cebada, véase, por ejemplo, Tingay *et al.*, "*Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation", The Plants Journal, (1997) 11: 1369–1376. Para la transformación mediada por *Agrobacterium*, del trigo, véase, por ejemplo, Cheng *et al.*, "Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*", Plant Physiol. 1997 Nov;115(3):971-980. Para la transformación mediada por *Agrobacterium*, del arroz, véase, por ejemplo, Hiei *et al.*, "Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*", Plant Mol. Biol. 1997 Sep;35 (1-2):205-18.

Los nombres latinos para estas plantas y para otras se dan a continuación. Debe ser evidente que pueden usarse otras técnicas de transformación (no *Agrobacterium*) para transformar genes unidos operativamente al promotor de un gen similar al metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*, por ejemplo, en estas plantas y en otras. Los ejemplos incluyen sin limitación; maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum* spp.), arroz (*Oriza* spp. y *Zizania* spp.), cebada (*Hordeum* spp.), algodón (*Abroma augusta* y *Gossipium* spp.), frijol de soya (*Glicine max*),

remolacha azucarera (*Beta* spp.), caña de azúcar (*Arenga pinnata*), tomate (*Licopersicon esculentum* y otras spp., *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* y otras spp. y *Cifomandra betacea*), papa (*Solanum tuberosum*), batata (*Ipomoea batatas*), centeno (*Secale* spp.), pimientos

5 (*Capsicum annuum*, *chinense* y *frutescens*), lechuga (*Lactuca sativa*, *perennis* y *pulchella*), coleóptero (*Brassica* spp.), apio (*Apium graveolens*), berenjena (*Solanum melongena*), maní (*Arachis hipogaea*), sorgo (*Sorghum* spp.), alfalfa (*Medicago sativa*), zanahoria (*Daucus carota*), garbanzos (*Phaseolus* spp. y otros géneros), avena (*Avena*

10 *sativa* y *strigosa*), guisantes (*Pisum*, *Vigna* y *Tetragonolobus* spp.), girasol (*Heliantus annuus*), calabaza (*Cucurbita* spp.), pepino (*Cucumis sativa*), tabaco (*Nicotiana* spp.), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), césped (*Lolium*, *Agrostis*, *Poa*, *Cinodon* y otros géneros), trébol (*Trifolium*), Vetch (*Vicia*). La transformación de tales plantas, con genes

15 unidos operativamente al promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon*, por ejemplo, se considera en algunas modalidades de la presente descripción.

El uso del promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* para impulsar genes unidos operativamente

20 puede implementarse en muchas especies madereras de hojas caducas y perennes. Tales aplicaciones también se encuentran dentro de los alcances de las modalidades de esta descripción. Estas especies incluyen sin limitación; aliso (*Alnus* spp.), fresno (*Fraxinus* spp.), especies de álamo temblón y álamo (*Populus* spp.), haya *Fagus* spp.),

25 abedul *Betula* spp.), cerezo *Prunus* spp.), eucalipto (*Eucaliptus* spp.),

nogal americano (*Carya* spp.), arce (*Acer* spp.), nogal (*Quercus* spp.) y pino (*Pinus* spp.).

El uso del promotor de un gen similar al de metalotioneína (*mtl*) de *Brachypodium distachyon* para impulsar los genes unidos
5 operativamente puede implementarse en especies ornamentales y frutales. Tales aplicaciones también se encuentran dentro de los alcances de las modalidades de esta descripción. Los ejemplos incluyen sin limitación; rosa (*Rosa* spp.), *Euonimus* spp., petunia (*Petunia* spp.), begonia (*Begonia* spp.), rododendro (*Rhododendron* spp.), manzana
10 silvestre o manzana (*Malus* spp.), peras (*Pirus* spp.), duraznos (*Prunus* spp.) y caléndulas (*Tagetes* spp.).

Si bien se han descrito anteriormente un número de aspectos y modalidades ilustrativas, los expertos en la técnica reconocerán determinadas modificaciones, permutaciones, adiciones y
15 subcombinaciones de éstos. Por ello la intención es que las siguientes reivindicaciones y las reivindicaciones de aquí en adelante se interpreten para incluir la totalidad de tales modificaciones, permutaciones, adiciones y subcombinaciones dentro de su verdadero espíritu y alcance.