

ELEMENTOS REGULADORES DE PLANTAS Y SUS USOS

REFERENCIA A SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/340,656, presentada el martes, 24 de mayo de 2016, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

El listado de secuencias incluido en el archivo de nombre "MONS419WO-sequence_listing.txt", de 14.1 KB (según se midió en Microsoft Windows®) y creado el 22 de mayo de 2017, se presenta junto con la presente en forma electrónica y se incorpora a la presente mediante referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a los campos de biología molecular de plantas y modificación genética de plantas. Más específicamente, la invención se refiere a moléculas de ADN útiles para modular la expresión génica en las plantas.

ANTECEDENTES

Los elementos reguladores son elementos genéticos que regulan la actividad génica al modular la transcripción de una molécula de ADN transcribible unida de forma operativa. Tales elementos pueden incluir promotores, líderes, intrones y regiones no traducida 3' y son útiles en los campos de la biología molecular y la modificación genética de las plantas.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención proporciona elementos reguladores génicos novedosos para utilizar en

plantas. La invención también proporciona construcciones de ADN que comprenden los elementos reguladores. La presente invención también proporciona células de plantas transgénicas, plantas y semillas que comprenden los elementos reguladores. En una modalidad, los elementos reguladores están unidos de forma operativa a una molécula de ADN transcribible. En determinadas modalidades, la molécula de ADN transcribible puede ser heteróloga con respecto a la secuencia reguladora. Por lo tanto, una secuencia de elemento regulador proporcionada por la invención puede, en modalidades particulares, ser definida como unida de forma operativa a una molécula de ADN transcribible heteróloga. La presente invención también proporciona métodos para hacer y utilizar los elementos reguladores, las construcciones de ADN que comprenden los elementos reguladores, y las células vegetales transgénicas, plantas y semillas que comprenden los elementos reguladores unidos de forma operativa a una molécula de ADN transcribible.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que se selecciona del grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos alrededor de 85 por ciento de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO:1-5 o 7; (b) una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:1-5 o 7; y (c) un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO:1-5 o 7, donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; donde la secuencia está unida de forma operativa a una molécula de ADN transcribible heteróloga. "Molécula de ADN transcribible heteróloga", significa que la molécula de ADN transcribible es heteróloga con respecto a la secuencia de polinucleótidos a la que está unida de forma operativa. En modalidades específicas, la molécula de ADN recombinante comprende una secuencia de ADN que tiene al menos alrededor de 90 por ciento, al menos 91 por ciento, al menos 92 por ciento, al menos 93 por ciento, al menos 94 por ciento, al menos 95 por ciento, al menos 96 por ciento, al menos 97 por ciento, al menos 98 por ciento, o al menos 99 por ciento de identidad de secuencia con la secuencia de ADN de cualquiera de las SEQ ID NO:1-5. En modalidades particulares, la secuencia de ADN comprende un elemento regulador. En algunas modalidades, el elemento regulador comprende un promotor. En aun otras modalidades, la molécula de ADN transcribible heteróloga comprende un gen de interés agronómico, tal como un gen capaz de proporcionar resistencia a herbicidas en plantas, o un gen capaz de proporcionar resistencia a pestes de plantas en las plantas. En aun otras modalidades, la invención proporciona una construcción que comprende una molécula de ADN recombinante tal como se proporciona en la presente.

En otro aspecto, se proporcionan en la presente células de plantas transgénicas que

comprenden una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que se selecciona del grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos alrededor de 85 por ciento de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO:1-5 o 7; (b) una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:1-5 o 7; y (c) un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO:1-5 o 7, donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; donde la secuencia de ADN está unida de forma operativa a una molécula de ADN transcribible heteróloga. En determinadas modalidades, la célula de planta transgénica es una célula de planta monocotiledónea. En otras modalidades, la célula de planta transgénica es una célula de planta monocotiledónea o una célula de planta dicotiledónea.

En aun otro aspecto, se proporciona además en la presente una planta transgénica, o parte de esta, que comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que se selecciona del grupo que consiste en: a) una secuencia con al menos 85 por ciento de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO:1-5 o 7; b) una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO:1-5 o 7; y c) un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO:1-5 o 7, donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; donde la secuencia está unida de forma operativa a una molécula de ADN transcribible heteróloga. En modalidades específicas, la planta transgénica es una planta de progenie de cualquier generación que comprende la molécula de ADN recombinante. Una semilla transgénica que comprende la molécula de ADN recombinante que produce tal planta transgénica cuando se cultiva también se proporciona en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un producto básico que comprende obtener una planta transgénica o parte de esta que contiene una molécula de ADN recombinante de la invención y produce el producto básico a partir de esta. En una modalidad, el producto básico es semillas procesadas, granos, partes de plantas, aceites y harina.

En aun otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una planta transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante de la invención que comprende transformar una célula de planta con la molécula de ADN recombinante de la invención para producir una célula de planta transformada y regenerar una planta transgénica desde la célula de la planta transformada.

En determinados aspectos, la invención proporciona métodos para producir una célula de planta transgénica que comprende introducir una molécula de ADN recombinante proporcionada en la presente en una célula de planta. En determinadas modalidades,

introducir dicha molécula de ADN recombinante en dicha célula de planta comprende la transformación o regeneración de una planta transgénica de dicha célula de planta. En modalidades adicionales, introducir dicha molécula de ADN recombinante en dicha célula de planta comprende cruzar una planta transgénica proporcionada en la presente con otra planta para producir una planta progenie que comprende dicha célula de planta.

En un aspecto adicional, la invención proporciona métodos para producir una planta transgénica que comprende transformar una célula de planta con una molécula de ADN recombinante proporcionada en la presente. En determinadas modalidades, los métodos de la invención comprenden además regenerar una planta transgénica de una célula de planta transformada con una molécula de ADN proporcionada en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

La SEQ ID NO:1 es una secuencia de ADN de un grupo de elementos de expresión reguladora (EXP) que comprende un promotor derivado de un gen de ubiquitina putativo de hierba Blue Grama (*Bouteloua gracilis*) unido de forma operativa 5' a su líder nativo que está unido de forma operativa 5' a su primer intrón nativo.

La SEQ ID NO:2 es una secuencia promotora derivada de un gen de ubiquitina putativo de la hierba Blue Grama (*Bouteloua gracilis*).

La SEQ ID NO:3 es una secuencia líder derivada de un gen de ubiquitina putativo de la hierba Blue Grama (*Bouteloua gracilis*).

La SEQ ID NO:4 es una secuencia de intrón derivada de un gen de ubiquitina putativo de la hierba Blue Grama (*Bouteloua gracilis*).

La SEQ ID NO:5 es una región no traducida 3' (UTR) derivada de un gen de ubiquitina putativo de la hierba Blue Grama (*Bouteloua gracilis*).

La SEQ ID NO:6 es una secuencia de codificación sintética que codifica la β -glucuronidasa diseñada para la expresión en una célula vegetal.

La SEQ ID NO:7 es un potenciador derivado del promotor del gen de ubiquitina putativo *Bouteloua gracilis*.

La SEQ ID NO:8 es una región no traducida 3' (UTR) derivada de un gen similar a la proteína de transferencia de lípidos (LTP) de *Oryza sativa*.

La SEQ ID NO:9 es un promotor potenciado y secuencia líder nativa derivado del virus del mosaico de la coliflor.

La SEQ ID NO:10 es una región no traducida 3' (UTR) derivada del gen de la nopalina

sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona moléculas de ADN que tienen actividad reguladora de genes en las plantas. Las secuencias de nucleótidos de estas moléculas de ADN se proporcionan como las SEQ ID NO:1-5 o 7. Estas moléculas de ADN son capaces de afectar la expresión de una molécula de ADN transcribible unida de forma operativa en tejidos de plantas, y por lo tanto se regula la expresión génica de un transgén unido de forma operativa en plantas transgénicas. La invención también proporciona métodos para modificar, producir y usar estas. La invención también proporciona composiciones que incluyen células de plantas transgénicas, plantas, partes de plantas y semillas que contienen las moléculas de ADN recombinante de la invención, y métodos para preparar y utilizarlos.

Se proporcionan las siguientes definiciones y métodos para definir mejor la presente invención y para guiar a los entendidos en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos que se indique lo contrario, los términos deben entenderse según el uso convencional que le dan los expertos en la técnica pertinente.

Moléculas de ADN

Tal como se usa en la presente, el término "ADN" o "molécula de ADN" se refiere a una molécula de ADN bicatenaria de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases de desoxirribonucleótidos o una molécula de ADN, leída desde el extremo 5' (corriente arriba) al extremo 3' (corriente abajo). Tal como se usa en la presente, el término "secuencia de ADN" se refiere a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN. La nomenclatura que se utiliza en la presente corresponde a la del Título 37 del Código de Reglamentos Federales de Estados Unidos § 1.822 e indicada en las tablas de la norma WIPO ST.25 (1998), Apéndice 2, Tablas 1 y 3.

Según se utiliza en la presente, una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que comprende una combinación de moléculas de ADN que no se produciría de forma natural sin la intervención humana. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante puede ser una molécula de ADN que está compuesta por al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí, una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que se desvía de las secuencias de ADN que existen en la naturaleza, o una molécula de ADN que se ha incorporado en el ADN de una célula hospedadora mediante transformación genética o edición génica.

Se pretende que la referencia en la presente solicitud a una "molécula aislada de ADN", o una frase o término equivalente, signifique que la molécula de ADN está presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no está en su entorno natural. Por ejemplo, los elementos de ácido nucleico, tales como una secuencia codificante, una secuencia de intrones, una secuencia líder no traducida, una secuencia promotora, una secuencia de terminación transcripcional y similares, que se encuentran naturalmente dentro del ADN del genoma de un organismo no se consideran "aisladas", siempre y cuando el elemento esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en el que se encuentra naturalmente. Sin embargo, cada uno de estos elementos, y subpartes de estos elementos, se encuentra "aislado" dentro del alcance de la presente descripción siempre que el elemento no se encuentre dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en el cual se encuentra naturalmente. De manera similar, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida o cualquier variante insecticida de origen natural de la proteína podría ser una secuencia de nucleótidos aislada siempre que la secuencia de nucleótidos no esté dentro del ADN de la bacteria en la cual la secuencia que codifica la proteína se encuentra naturalmente. Una secuencia sintética de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína insecticida de origen natural se podría considerar aislada a los fines de la presente descripción. Para los fines de la presente descripción, cualquier secuencia de nucleótidos transgénica, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en el genoma de las células de una planta o bacteria o presente en un vector extracromosómico, se considera una secuencia de nucleótidos aislada si está presente dentro de la estructura de plásmido o similar utilizada para transformar las células, dentro del genoma de la planta o bacteria o presente en cantidades detectables en tejidos, progenie, muestras biológicas o productos básicos derivados de la planta o bacteria.

Tal como se usa en la presente, el término "identidad de secuencia" se refiere al grado en que son idénticas dos secuencias de polinucleótidos óptimamente alineadas o dos secuencias de polipéptidos óptimamente alineadas. Una alineación de secuencias óptima se crea alineando manualmente dos secuencias, por ejemplo, una secuencia de referencia y otra secuencia, para maximizar la cantidad de emparejamientos de nucleótidos en la alineación de secuencias con huecos, eliminaciones o inserciones de nucleótidos internas adecuadas. Tal como se usa en la presente, el término "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia de ADN proporcionado como las SEQ ID NO:1-5 o 7.

Tal como se usa en la presente, el término "porcentaje de identidad de secuencia" o

"identidad porcentual" o "% de identidad" es la fracción de identidad multiplicada por 100. La "fracción de identidad" para una secuencia óptimamente alineada con una secuencia de referencia es la cantidad de emparejamientos de nucleótidos en la alineación óptima, dividida entre la cantidad total de nucleótidos en la secuencia de referencia, por ejemplo, la cantidad total de nucleótidos en toda la extensión de la secuencia de referencia completa. Por lo tanto, una modalidad de la invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia que, cuando está óptimamente alineada a una secuencia de referencia, proporcionada en la presente como las SEQ ID NO:1-5 y 7, tiene al menos alrededor de 85 por ciento de identidad, al menos alrededor de 86 por ciento de identidad, al menos alrededor de 87 por ciento de identidad, al menos alrededor de 88 por ciento de identidad, al menos alrededor de 89 por ciento de identidad, al menos alrededor de 90 por ciento de identidad, al menos alrededor de 91 por ciento de identidad, al menos alrededor de 92 por ciento de identidad, al menos alrededor de 93 por ciento de identidad, al menos alrededor de 94 por ciento de identidad, al menos alrededor de 95 por ciento de identidad, al menos alrededor de 96 por ciento de identidad, al menos alrededor de 97 por ciento de identidad, al menos alrededor de 98 por ciento de identidad, al menos alrededor de 99 por ciento de identidad, o al menos alrededor de 100 por ciento de identidad respecto a la secuencia de referencia. En determinadas modalidades, en la presente se proporcionan secuencias que tienen un porcentaje de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 1-5 o 7, y que tienen la actividad de la secuencia de longitud completa.

Elementos reguladores

Los elementos reguladores tales como los promotores, líderes (también conocidos como UTR 5'), potenciadores, intrones, y regiones de terminación de transcripción (también conocidas como UTR 3') juegan una parte integral en la expresión general de genes en las células vivas. El término "elemento regulador", tal como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ADN que tiene actividad reguladora de genes. El término "actividad reguladora de genes", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la capacidad de afectar la expresión de una molécula de ADN transcribible unida de forma operativa, por ejemplo al afectar la transcripción y/o traducción de la molécula de ADN transcribible unida de forma operativa. Los elementos reguladores, tales como los promotores, líderes, potenciadores, intrones y UTR 3' que funcionan en las plantas son por lo tanto útiles para modificar los fenotipos de las plantas a través de la modificación genética.

Tal como se usa en la presente, un "grupo de elemento de expresión reguladora" o secuencia "EXP" puede referirse a un grupo de elementos reguladores unidos de forma

operativa, tales como potenciadores, promotores, líderes e intrones. Por lo tanto, un grupo de elemento de expresión reguladora puede comprender, por ejemplo, un promotor unido de forma operativa 5' a una secuencia líder. Una EXP útil para practicar la presente invención se presenta como la SEQ ID NO:1.

Los elementos reguladores se pueden caracterizar por su patrón de expresión génica, por ejemplo, efectos positivos y/o negativos tales como expresión constitutiva o temporal, espacial, de desarrollo, tejido, medioambiental, fisiológica, patológica, ciclo celular, y/o de expresión que responde químicamente, y cualquier combinación de estos, así como mediante indicaciones cuantitativas o cualitativas. Tal como se usa en la presente, un "patrón de expresión génica" es cualquier patrón de transcripción de una molécula de ADN unida de forma operativa en una molécula de ARN transcrita. La molécula de ARN transcrita se puede traducir para producir una molécula de proteína o puede proporcionar una función de molécula de ARN antisentido u otra reguladora, tal como un ARN de doble cadena (ARNcd), un ARN de transferencia (ARNt), un ARN ribosómico (ARNr), un microARN (miARN), y similares.

Tal como se usa en la presente, el término "expresión de proteína" es cualquier patrón de traducción de una molécula de ARN transcrita en una molécula de proteína. La expresión de proteína se puede caracterizar por sus calidades temporales, espaciales, de desarrollo o morfológicas, así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas.

Un promotor es útil como un elemento regulador para la modulación de la expresión de una molécula de ADN transcribible unida de manera operativa. Tal como se usa en la presente, el término «promotor» hace referencia, en términos generales, a una molécula de ADN involucrada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa II y otras proteínas, tales como factores de transcripción de acción en trans, para iniciar la transcripción. Un promotor puede aislarse inicialmente de la región no traducida 5' (UTR 5') de una copia genómica de un gen. De manera alternativa, los promotores pueden ser moléculas de ADN producidas de manera sintética o manipulada. Los promotores también pueden ser quiméricos. Los promotores quiméricos se producen a través de la fusión de dos o más moléculas de ADN heterólogas. Un promotor que es útil para practicar la presente invención incluye elementos promotores comprendidos dentro de la SEQ ID NO:2, o fragmentos o variantes de estos. En modalidades específicas de la invención, las moléculas de ADN reivindicadas y cualquier variante o derivado de estos tal como se describe en la presente, se definen adicionalmente como que comprenden actividad promotora, es decir, son capaces de actuar como un promotor en una célula hospedadora, tal como en una planta transgénica.

En aun más modalidades específicas, un fragmento se puede definir como que exhibe actividad promotora poseída por la molécula promotora de inicio de la cual deriva, o un fragmento puede comprender un "promotor mínimo" que proporciona un nivel basal de transcripción y comprende una caja TATA, otro motivo de sitio de unión de factor de transcripción conocido, o secuencia de ADN equivalente para el reconocimiento y unión del complejo de polimerasa II de ARN para el inicio de la transcripción.

En una modalidad, se proporcionan los fragmentos de una secuencia promotora descrita en la presente. Los fragmentos de promotores pueden comprender actividad promotora, tal como se describe anteriormente, y pueden ser útiles solos o en combinación con otros promotores y fragmentos promotores, tal como en promotores quiméricos de construcción, o en combinación con otros elementos de expresión y fragmentos de elemento de expresión. En modalidades específicas, se proporcionan fragmentos de un promotor que comprenden al menos alrededor de 50, al menos alrededor de 75, al menos alrededor de 95, al menos alrededor de 100, al menos alrededor de 125, al menos alrededor de 150, al menos alrededor de 175, al menos alrededor de 200, al menos alrededor de 225, al menos alrededor de 250, al menos alrededor de 275, al menos alrededor de 300, al menos alrededor de 500, al menos alrededor de 600, al menos alrededor de 700, al menos alrededor de 750, al menos alrededor de 800, al menos alrededor de 900, o al menos alrededor de 1000 nucleótidos contiguos, o más, de una molécula de ADN que tiene actividad promotora tal como se describe en la presente. En determinadas modalidades, se proporcionan en la presente fragmentos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-5 y 7, que tienen la actividad de la secuencia de longitud completa. Los métodos para producir tales fragmentos a partir de una molécula promotora inicial son conocidos en la técnica.

Las composiciones derivadas de cualquiera de los elementos promotores comprendidos dentro de la SEQ ID NO:2 tal como eliminaciones 5' o internas, por ejemplo, se pueden producir utilizando métodos conocidos en la técnica para mejorar o alterar la expresión, que incluye al quitar elementos que tienen ya sea efectos positivos o negativos en la expresión; duplicar elementos que tienen efectos positivos o negativos en la expresión; y/o duplicar o quitar elementos que tienen efectos específicos de la célula o tejido en la expresión. Las composiciones derivadas de cualquiera de los elementos promotores comprendidos dentro de la SEQ ID NO:2 que comprende eliminaciones 3' en las que se quita el elemento de caja TATA o la secuencia equivalente de este y la secuencia corriente abajo pueden ser usadas, por ejemplo, para elaborar elementos potenciadores. Se pueden realizar eliminaciones adicionales para quitar cualesquiera elementos que tienen efectos positivos o negativos;

específicos al tejido; específicos a la célula; específicos al tiempo (tal como, de modo no taxativo, ritmo circadiano) en la expresión. Cualquiera de los elementos promotores comprendidos dentro de la SEQ ID NO:2 y los fragmentos o potenciadores derivados a partir de estos se pueden utilizar para elaborar composiciones de elementos reguladores transcripcionales quiméricos.

De acuerdo con la invención, un promotor o fragmento de promotor se puede analizar para buscar la presencia de elementos promotores conocidos, es decir, las características de secuencia de ADN, tal como una caja TATA y otros motivos de sitios de unión de factor de transcripción conocidos. La identificación de tales elementos promotores conocidos puede ser utilizada por un experto en la técnica para diseñar variantes del promotor que tiene un patrón de expresión similar al promotor original.

Tal como se usa en la presente, el término "líder" hace referencia a una molécula de ADN aislada de la región 5' no traducida (5' UTR) de un gen y se define, en términos generales, como un segmento de nucleótidos entre el sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés) y el sitio de inicio de la secuencia de codificación de proteínas. De manera alternativa, las líderes pueden ser elementos de ADN producidos de manera sintética o manipulada. Se puede usar una líder como un elemento regulador 5' para la modulación de la expresión de una molécula de ADN transcribible enlazada de manera operativa. Las moléculas líder se pueden utilizar con un promotor heterólogo o con su promotor nativo. Las líderes útiles para practicar la presente invención se presentan como la SEQ ID NO:3, o cualquiera de los elementos líderes comprendidos dentro de la SEQ ID NO:3 o fragmentos o variantes de estos. En modalidades específicas, tales secuencias de ADN se pueden definir como capaces de actuar como un líder en una célula hospedadora, que incluye, por ejemplo, una célula de planta transgénica. En una modalidad, tales secuencias están decodificadas como que comprenden actividad líder.

Las secuencias líder (también referidas como UTR 5') presentadas como la SEQ ID NO:3, o cualquiera de los elementos líder comprendidos dentro de la SEQ ID NO:3, pueden comprender elementos reguladores, o pueden adoptar estructuras secundarias que pueden tener un efecto en la transcripción o traducción de una molécula de ADN transcribible unida de forma operativa. La secuencia líder presentada como la SEQ ID NO:3 o cualquiera de los elementos líder comprendidos dentro de la SEQ ID NO:3 se pueden utilizar de acuerdo con la invención para elaborar elementos reguladores quiméricos que afectan la transcripción o traducción de una molécula de ADN transcribible unida de forma operativa.

Tal como se usa en la presente, el término "intrón" hace referencia a una molécula de ADN

que puede aislarse o identificarse a partir de un gen y puede definirse, en términos generales, como una región sometida a corte y empalme durante el procesamiento de ARN mensajero (ARNm) antes de la traducción. De manera alternativa, un intrón puede ser un elemento de ADN producido de manera sintética o manipulada. Un intrón puede contener elementos potenciadores que efectúen la transcripción de genes enlazados de manera operativa. Se puede usar un intrón como un elemento regulador para la modulación de la expresión de una molécula de ADN transcribible enlazada de manera operativa. Una construcción puede comprender un intrón y el intrón puede ser o no heterólogo con respecto a la molécula de ADN transcribible. Ejemplos de intrones en la técnica incluyen el intrón de actina de arroz y el intrón HSP70 de maíz.

En las plantas, la inclusión de algunos intrones en las construcciones génicas lleva a ARNm aumentado y a la acumulación de proteína relativa a construcciones a las que les falta el intrón. Este efecto ha sido denominado "potenciamiento mediado por intrón" (IME) de expresión génica. Los intrones conocidos por estimular la expresión en las plantas han sido identificados en los genes del maíz (por ejemplo, *tubA1*, *Adh1*, *Sh1* y *Ubi1*), en genes de arroz (por ejemplo, *tpi*) y en los genes de plantas dicotiledóneas como aquellas de la petunia (por ejemplo, *rbcS*), papa (por ejemplo, *st-ls1*), y de *Arabidopsis thaliana* (por ejemplo, *ubq3* y *pat1*). Se ha demostrado que las eliminaciones o mutaciones dentro de los sitios de corte y empalme de un intrón reducen la expresión génica, lo que indica que el corte y empalme puede ser necesario para IME. Sin embargo, IME en plantas dicotiledóneas ha sido demostrado por mutaciones puntuales dentro de los sitios de corte y empalme del gen *pat1* de *A. thaliana*. Se ha mostrado que múltiples usos del mismo intrón en una planta exhiben desventajas. En esos casos, es necesario tener una colección de elementos de control básico para la construcción de elementos de ADN recombinante apropiados.

Un intrón útil para practicar la invención se presenta como la SEQ ID NO:4. Las composiciones derivadas del intrón presentadas como la SEQ ID NO:4 puede comprender eliminaciones internas o duplicados de elementos reguladores *cis*. Además, las alteraciones de las secuencias 5' y 3' que comprenden las uniones de corte y empalme intrón/exón se pueden utilizar para mejorar la expresión o especificidad de expresión cuando están operativamente unidas a un promotor + líder o promotor quimérico + líder y secuencia de codificación. Cuando se modifican las secuencias limitantes de intrón/exón, puede ser beneficioso evitar utilizar la secuencia de nucleótidos AT o el nucleótido A justo antes del extremo 5' del sitio de corte y empalme (GT) y el nucleótido G o la secuencia de nucleótidos TG justo después del extremo 3' del sitio de corte y empalme (AG) para eliminar el potencial

de que se formen codones de inicio no deseados durante el procesamiento del ARN mensajero en la transcripción final. La secuencia de ADN alrededor de los sitios de unión de corte de empalme de extremo 5' o 3' del intrón se puede modificar en esta manera. El intrón y las variantes de intrón alterados tal como se describe en la presente y a través de métodos conocidos en la técnica se pueden evaluar de forma empírica tal como se describe en los ejemplos de trabajo para determinar el efecto del intrón en la expresión de una molécula de ADN unida de forma operativa. Las alteraciones de las regiones 5' y 3' que comprenden la unión de corte y empalme de intrón/exón también se pueden realizar para reducir el potencial de introducción de un falso inicio y codones de detención que se producen en la transcripción resultante después de procesar y cortar y empalmar el ARN mensajero. Los intrones se pueden evaluar de forma empírica tal como se describe en los ejemplos de trabajo para determinar el efecto del intrón en la expresión de un transgén. En una modalidad, se proporcionan los fragmentos de una secuencia de intrón descrita en la presente. Los fragmentos del intrón pueden comprender la actividad de la secuencia del intrón de longitud completa, y puede ser útil solo o en combinación con otros intrones o elementos reguladores o fragmentos de elementos de expresión. En modalidades específicas, se proporcionan fragmentos de un intrón que comprenden al menos alrededor de 50, al menos alrededor de 75, al menos alrededor de 95, al menos alrededor de 100, al menos alrededor de 125, al menos alrededor de 150, al menos alrededor de 175, al menos alrededor de 200, al menos alrededor de 225, al menos alrededor de 250, al menos alrededor de 275, al menos alrededor de 300, al menos alrededor de 500, al menos alrededor de 600, al menos alrededor de 700, al menos alrededor de 750, al menos alrededor de 800, al menos alrededor de 900, o al menos alrededor de 1000 nucleótidos contiguos, o más, de una molécula de ADN que tiene actividad de intrón tal como se describe en la presente. En determinadas modalidades, se proporcionan en la presente fragmentos de la SEQ ID NO: 4, que tienen la actividad de la secuencia de longitud completa. Los métodos para producir tales fragmentos a partir de una molécula de intrón inicial son conocidos en la técnica.

Tal como se usa en la presente, los términos "molécula de terminación de transcripción 3'", "región no traducida 3'" o "UTR 3'" se refieren a una molécula de ADN que se utiliza durante la transcripción a la región no traducida de la parte 3' de una molécula de ARNm. La región no traducida 3' de una molécula de ARNm se puede generar mediante escisión específica y poliadenilación 3', también conocida como una cola poliA. Una UTR 3' puede estar unida de forma operativa a y ubicada corriente abajo de una molécula de ADN transcribible y

puede incluir una señal de poliadenilación y otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción, el procesamiento de ARNm, o expresión génica. Se cree que las colas poliA funcionan en estabilidad de ARNm y en el inicio de la traducción. Ejemplos de moléculas de terminación de transcripción 3' en la técnica son la región 3' de nopalina sintasa, la región 3' hsp17 de trigo, la región 3' de subunidad pequeña de arveja rubisco, la región 3' E6 de algodón y la UTR 3' de coixina.

Las UTR 3' típicamente encuentran uso beneficioso para la expresión recombinante de moléculas de ADN específicas. Una UTR 3' débil tiene el potencial de generar revisión, que puede afectar la expresión de la molécula de ADN ubicada en los casetes de expresión circundantes. Un control apropiado de la terminación de la transcripción puede evitar la revisión en secuencias de ADN (por ejemplo, otros casetes de expresión) ubicados corriente abajo y pueden además permitir un reciclado eficiente del ARN polimerasa para mejorar la expresión génica. La terminación eficiente de la transcripción (liberación del ARN Polimerasa II del ADN) es requisito previo para el reinicio de la transcripción y de este modo afecta directamente el nivel de transcripción general. Posterior a la terminación de transcripción, el ARNm maduro se libera del sitio de síntesis y se transporta al citoplasma. Las ARNm eucariotas están acumuladas como formas poli(A) *in vivo*, lo que hace difícil detectar los sitios de terminación transcripcionales mediante métodos convencionales. Además, la predicción de las UTR 3' funcionales y eficientes mediante métodos bioinformáticos es difícil dado que no hay secuencias de ADN conservadas que permitirían la predicción fácil de una UTR 3' efectiva.

Desde un punto de vista práctico, típicamente es beneficioso que una UTR 3' utilizada en un casete de expresión posea las siguientes características. Primero, la UTR 3' debería ser capaz de terminar de forma eficiente y eficaz la transcripción del transgén y evitar la revisión de la transcripción en cualquier secuencia de ADN circundante, que puede comprender otro casete de expresión como en el caso de múltiples casetes de expresión que residen en un ADN de transferencia (ADN-T), o el ADN cromosómico circundante en el que se ha insertado el ADN-T. Segundo, la UTR 3' no debería causar una reducción en la actividad transcripcional impartida por el promotor, líder, potenciadores e intrones que se utilizan para llevar la expresión de la molécula de ADN. Finalmente, en la biotecnología de las plantas, la UTR 3' generalmente se utiliza para el cebado de las reacciones de amplificación de ARN de transcripción inversa extraído de la planta transformada y utilizado para: (1) evaluar la actividad transcripcional o expresión del casete de expresión una vez integrado en el cromosoma de la planta; (2) evaluar el número de copias de inserciones dentro del ADN de

la planta; y (3) evaluar la cigosidad de la semilla resultante luego del cultivo. La UTR 3' también se utiliza en las reacciones de amplificación del ADN extraído de la planta transformada para caracterizar la integridad del casete insertado. Un UTR 3' de ejemplo útil para practicar la invención se presenta como la SEQ ID NO:5.

En una modalidad, se proporcionan los fragmentos de una UTR 3' descrita en la presente. Los fragmentos de la UTR 3' pueden comprender la actividad de la secuencia de la UTR 3' de longitud completa, y puede ser útil solo o en combinación con otros elementos reguladores o fragmentos de elementos de expresión. En modalidades específicas, se proporcionan fragmentos de una UTR 3' que comprenden al menos alrededor de 50, al menos alrededor de 75, al menos alrededor de 95, al menos alrededor de 100, al menos alrededor de 125, al menos alrededor de 150, al menos alrededor de 175, al menos alrededor de 200, al menos alrededor de 225, al menos alrededor de 250, al menos alrededor de 275, al menos alrededor de 300, al menos alrededor de 500, al menos alrededor de 600, al menos alrededor de 700, al menos alrededor de 750, al menos alrededor de 800, al menos alrededor de 900, o al menos alrededor de 1000 nucleótidos contiguos, o más, de una molécula de ADN que tiene actividad de UTR 3' tal como se describe en la presente. En determinadas modalidades, se proporcionan en la presente fragmentos de la SEQ ID NO: 5, que tienen la actividad de la secuencia de longitud completa. Los métodos para producir tales fragmentos a partir de una molécula de UTR 3' inicial son conocidos en la técnica.

Tal como se usa en la presente, el término "potenciador" o "elemento potenciador" hace referencia a un elemento regulador que actúa como *cis*, es decir, un elemento *cis*, que confiere un aspecto del patrón de expresión a nivel general, pero que es habitualmente insuficiente por sí solo para impulsar la transcripción, de una molécula de ADN transcribible enlazada de manera operativa. A diferencia de los promotores, los elementos potenciadores habitualmente no incluyen un sitio de inicio de la transcripción (TSS), la caja TATA o la secuencia de ADN equivalente. Un promotor o fragmento de promotor puede comprender de manera natural uno o más elementos potenciadores que afecten la transcripción de una secuencia de ADN unido de manera operativa. Un elemento potenciador también puede fusionarse con un promotor para producir un elemento *cis* promotor quimérico que confiera un aspecto de la modulación a nivel general de la expresión génica. Un ejemplo de un elemento potenciador derivado del promotor del gen de ubiquitina putativa *Bouteloua gracilis* útil para practicar la invención se presenta como la SEQ ID NO:7.

Se cree que muchos elementos promotores-potenciadores se unen a proteínas de unión a

ADN y/o afectan la topología del ADN, mediante lo cual se producen conformaciones locales que permiten o restringen de manera selectiva el acceso de la ARN polimerasa a la plantilla de ADN o que facilitan la apertura selectiva de la doble hélice en el sitio de inicio de la transcripción. Un elemento potenciador puede funcionar para unir factores de transcripción que regulen la transcripción. Algunos elementos potenciadores se unen a más de un factor de transcripción y los factores de transcripción pueden interactuar con afinidades diferentes con más de un dominio potenciador. Los elementos potenciadores se pueden identificar mediante una cantidad de técnicas, que incluyen el análisis de eliminación, es decir, eliminar uno o más nucleótidos del extremo 5' o interno a un promotor, análisis de proteína de unión a ADN utilizando análisis de huella DNasa I, interferencia de metilación, ensayos de cambio de movilidad electroforética, análisis de huella genómica in vivo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediada por ligación y otros ensayos convencionales, o mediante análisis de similitud de secuencia de ADN utilizando motivos de elemento *cis* conocidos o elementos potenciadores como una secuencia objetivo o motivo objetivo con métodos de comparación de secuencia de ADN convencional, tal como BLAST. La estructura fina de un dominio potenciador se puede estudiar adicionalmente mediante mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o mediante otros métodos convencionales conocidos en la técnica. Los elementos potenciadores se pueden obtener mediante síntesis química o mediante aislamiento de elementos reguladores que incluyen tales elementos, y se pueden sintetizar con nucleótidos flanqueantes adicionales que contienen sitios de enzima de restricción útiles para facilitar la manipulación de la subsecuencia. El diseño, construcción y uso de elementos potenciadores para modular la expresión de moléculas de ADN transcribibles unidas de forma operativa están abarcadas por la invención.

Como se usa en la presente, el término "quimérico" se refiere a una molécula de ADN individual producida mediante la fusión de una primera molécula de ADN con una segunda molécula de ADN, donde ni la primera ni la segunda molécula de ADN se encontraría normalmente en esa configuración, es decir, fusionadas entre sí. La molécula de ADN quimérica es por lo tanto una nueva molécula de ADN que de otro modo no se encontraría normalmente en la naturaleza. Tal como se usa en la presente, el término "promotor quimérico" se refiere a un promotor producido a través de tal manipulación de las moléculas de ADN. Un promotor quimérico puede combinar dos o más fragmentos de ADN; por ejemplo, la fusión de un promotor a un elemento potenciador. El diseño, construcción y uso de promotores quiméricos para modular la expresión de moléculas de ADN transcribibles

unidades de forma operativa están abarcadas por la invención.

Los elementos reguladores quiméricos se pueden diseñar para comprender varios elementos constituyentes que pueden estar unidos de forma operativa mediante varios métodos conocidos en la técnica, tales como la digestión y la ligación de la enzima de restricción, clonación independiente de la ligación, ensamblaje modular de los productos de PCR durante la amplificación, o síntesis química directa del elemento regulador, así como otros métodos conocidos en la técnica. Los varios elementos reguladores quiméricos resultantes pueden comprender estos, o variantes de estos, elementos constituyentes pero difieren en la secuencia de ADN o secuencias de ADN que comprenden la secuencia o secuencias de ADN de unión que permite que las partes constituyentes estén unidas de forma operativa. En la invención, las secuencias de ADN proporcionadas como las SEQ ID NO:1-5 o 7 pueden proporcionar secuencias de referencia de elementos reguladores, donde los elementos constituyentes que comprenden la secuencia de referencia pueden estar unidos por métodos conocidos en la técnica y pueden comprender sustituciones, eliminaciones, y/o inserciones de uno o más nucleótidos o mutaciones que ocurren de forma natural en la transformación bacteriana y de la célula de la planta.

Tal como se usa en la presente, el término "variante" se refiere a una segunda molécula de ADN, tal como un elemento regulador, que es en composición similar, pero no idéntica, a una primera molécula de ADN, y donde la segunda molécula de ADN aún mantiene la funcionalidad general, es decir, el mismo patrón de expresión o uno similar, por ejemplo a través de actividad transcripcional más o menos equivalente, de la primera molécula de ADN. Una variante puede ser una versión más corta o truncada de la primera molécula de ADN o una versión alterada de la secuencia de la primera molécula de ADN, tal como una con diferentes sitios de enzima de restricción o eliminaciones, sustituciones o inserciones internas. Una "variante" también puede abarcar un elemento regulador que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, eliminación o inserción de uno o más nucleótidos de una secuencia de referencia, donde el elemento regulador derivado tiene más o menos o equivalente actividad transcripcional o traduccional que la molécula reguladora original correspondiente. Las "variantes" del elemento regulador también abarcarán variantes que surgen de mutaciones que ocurren naturalmente en transformación de células de plantas y bacterias. En la presente invención, las secuencias del polinucleótido proporcionadas como las SEQ ID NO:1-5 o 7 pueden ser utilizadas para crear variantes que son similares en composición, pero no idénticas a, la secuencia de ADN del elemento regulador original, mientras que aún mantiene la funcionalidad general, es

decir, el mismo patrón de expresión o uno similar, del elemento regulador original. La producción de tales variantes de la invención se encuentra dentro del experto en la técnica en vista de la descripción y está abarcada dentro del alcance de la invención.

La eficacia de las modificaciones, duplicados o eliminaciones descritos en la presente en los aspectos de la expresión deseada de un transgén particular se puede evaluar de forma empírica en ensayos de plantas estables y temporales, tales como aquellos descritos en los ejemplos de trabajo en la presente, para validar los resultados que pueden variar dependiendo de los cambios hechos y la finalidad del cambio en la molécula de ADN de inicio.

Construcciones

Tal como se usa en la presente, el término "construcción" significa cualquier molécula de ADN recombinante tal como un plásmido, cósmido, virus, fago, o ADN lineal o circular o molécula de ARN, derivado de cualquier fuente, capaz de integración genómica o replicación autónoma, que comprende una molécula de ADN donde al menos una molécula de ADN ha sido unida a otra molécula de ADN en una manera funcionalmente operativa, es decir, unida de forma operativa. Tal como se usa en la presente, el término "vector" significa cualquier construcción que puede ser utilizada con el fin de transformación, es decir, la introducción de ARN o ADN heterólogo en una célula hospedadora. Una construcción típicamente incluye uno o más casetes de expresión. Tal como se usa en la presente, un "casete de expresión" se refiere a una molécula de ADN que comprende al menos una molécula de ADN transcribible unida de forma operativa a uno o más elementos reguladores, típicamente al menos un promotor y una UTR 3',

Tal como se usa en la presente, el término "unido de forma operativa" se refiere a una primera molécula de ADN unida a una segunda molécula de ADN, donde la primera y segunda molécula de ADN están dispuestas de forma que la primera molécula de ADN afecta la función de la segunda molécula de ADN. Las dos moléculas de ADN pueden o no ser parte de una única molécula de ADN contigua y pueden o no ser adyacentes. Por ejemplo, un promotor está unido de forma operativa a una molécula de ADN transcribible si el promotor modula la transcripción de la molécula de ADN transcribible de interés en una célula. Un líder, por ejemplo, está unido de forma operativa a una secuencia de ADN cuando es capaz de afectar la transcripción o traducción de la secuencia de ADN.

Las construcciones de la invención se pueden proporcionar, en una modalidad, como construcciones de borde de plásmido que induce tumores (Ti) dobles que tienen las regiones del borde derecho (RB o AGRtu.RB) y el borde izquierdo (LB o AGRtu.LB) del

plásmido Ti aislados de *Agrobacterium tumefaciens* que comprende una ADN- T que, junto con las moléculas de transferencia proporcionadas por las células *A. tumefaciens*, permiten la integración del ADN-T en el genoma de una célula de planta (ver, por ejemplo, la patente estadounidense 6,603,061). Las construcciones también pueden contener los segmentos de ADN de estructura principal de plásmido que proporcionan la función de replicación y la selección de antibióticos en las células bacterianas, por ejemplo, un origen de replicación de *Escherichia coli* tal como ori322, un origen de replicación de amplio rango de hospedador tal como oriV u oriRi, y una región de codificación para un marcador seleccionable tal como Spec/Strp que codifica Tn7 aminoglicósido adeniltransferasa (aadA) que confiere resistencia a la espectinomicina o estreptomycin, o un gen marcador seleccionable de gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación de las plantas, la cepa bacteriana hospedadora generalmente es *A. tumefaciens* ABI, C58, o LBA4404; sin embargo, otras cepas conocidas por los expertos en la técnica de la transformación de plantas puede funcionar en la invención.

Se conocen métodos en la técnica para ensamblar e introducir construcciones en una célula de tal manera que la molécula de ADN transcribible se transcribe en una molécula de ARNm funcional que se traduce y expresa como una proteína. Para la práctica de la invención, las composiciones convencionales y los métodos para preparar y usar construcciones y células hospedadoras son conocidas por los expertos en la técnica. Los vectores típicos útiles para la expresión de ácidos nucleicos en plantas más altas son conocidos en la técnica e incluyen vectores derivados del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* y el vector de control de transferencia de pCaMVN.

Varios elementos reguladores pueden estar incluidos en una construcción, que incluyen cualquiera de aquellos proporcionados en la presente. Cualquiera de tales elementos reguladores se puede proporcionar en combinación con otros elementos reguladores. Tales combinaciones se pueden diseñar o modificar para producir características reguladoras deseables. En una modalidad, las construcciones de la invención comprenden al menos un elemento regulador unido de forma operativa a una molécula de ADN transcribible unida de forma operativa a una UTR 3'.

Las construcciones de la invención pueden incluir cualquier promotor o líder proporcionado en la presente o conocido en la técnica. Por ejemplo, un promotor de la invención puede estar unido de forma operativa a un líder 5' no traducido heterólogo tal como uno derivado de un gen de proteína de choque térmico. De manera alternativa, un líder de la invención puede estar unido de forma operativa a un promotor heterólogo tal como el promotor de

transcripción del virus de mosaico de la coliflor 35S.

Los casetes de expresión pueden también incluir una secuencia de codificación de péptidos de tránsito que codifica un péptido que es útil para el direccionamiento subcelular de una proteína unida de forma operativa, particularmente a un cloroplasto, leucoplasto, u otro organelo plástido; mitocondria; peroxisoma; vacuola; o una ubicación extracelular. Muchas de las proteínas localizadas en cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se dirigen al cloroplasto mediante un péptido de tránsito a cloroplastos (CTP, por sus siglas en inglés). Los ejemplos de dichas proteínas de cloroplastos aislados incluyen, de modo no taxativo, las asociadas con la subunidad pequeña (SSU) de ribulosa-1,5,-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, la proteína I y proteína II del complejo captador de luz, tioredoxina F, y enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS). Los péptidos de tránsito de cloroplasto se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 7,193,133. Se ha demostrado que las proteínas que no son cloroplasto pueden ser dirigidas al cloroplasto por la expresión de un CTP heterólogo unido de forma operativa al transgén que codifica una proteína que no es cloroplasto.

Moléculas de ADN transcribible

Tal como se usa en la presente, el término "molécula de ADN transcribible" se refiere a cualquier molécula de ADN capaz de ser transcripta en una molécula de ARN, que incluye, de modo no taxativo, aquellas que tienen secuencias de codificación de proteína y aquellas que produce moléculas de ARN que tienen secuencias útiles para supresión de genes. El tipo de molécula de ADN puede incluir, de modo no taxativo, una molécula de ADN de la misma planta, una molécula de ADN de otra planta, una molécula de ADN de un organismo diferente, o una molécula de ADN sintética, tal como una molécula de ADN que contiene un mensaje antisentido de un gen, o una molécula de ADN que codifica una versión artificial, sintética o de otro modo modificada de un transgén. Moléculas de ADN transcribibles de ejemplo para incorporación en construcciones de la invención incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN o genes de una especie en la que la molécula de ADN está incorporada o los genes que se originan de, o están presentes en, las mismas especies, pero están incorporados en células receptoras mediante métodos de modificación genética en vez de las clásicas técnicas de cultivo.

Un "transgén" se refiere a una molécula de ADN transcribible heteróloga a una célula hospedadora al menos con respecto a su ubicación en el genoma de la célula hospedadora o una molécula de ADN transcribible incorporada artificialmente en un genoma de la célula hospedadora en la generación actual o cualquiera anterior de la célula.

Un elemento regulador, tal como un promotor de la invención, puede estar unido de forma operativa a una molécula de ADN transcribible que es heteróloga con respecto al elemento regulador. Tal como se usa en la presente, el término "heterólogo" se refiere a la combinación de dos o más moléculas de ADN cuando dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, se pueden derivar las dos moléculas de ADN de especies diferentes o las dos moléculas de ADN se pueden derivar de genes diferentes, por ejemplo, genes diferentes de las mismas especies o los mismos genes de diferentes especies. Un elemento regulador es por lo tanto heterólogo con respecto a una molécula de ADN transcribible unida de forma operativa si tal combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza, es decir, la molécula de ADN transcribible no ocurre naturalmente unida de forma operativa al elemento regulador.

La molécula de ADN transcribible puede generalmente ser cualquier molécula de ADN para la cual se desea la expresión de una transcripción. Tal expresión de una transcripción puede tener como resultado una traducción de la molécula de ARNm resultante, y por lo tanto la expresión de la proteína. De manera alternativa, por ejemplo, una molécula de ADN transcribible puede diseñarse para causar en última instancia la expresión disminuida de una proteína o gen específico. En una modalidad, esto se puede lograr al utilizar una molécula de ADN transcribible que se orienta en la dirección antisentido. Un experto en la técnica está familiarizado con utilizar tal tecnología antisentido. Cualquier gen puede regularse de forma negativa de esta manera, y, en una modalidad, una molécula de ADN transcribible se puede diseñar para la supresión de una expresión a través del gen específico de una molécula ARNcd, ARNip o miARN.

Por lo tanto una modalidad de la invención es una molécula de ADN recombinante que comprende un elemento regulador de la invención, tal como aquellos proporcionados como las SEQ ID NO:1-5 o 7, unidos de forma operativa a una molécula de ADN transcribible heteróloga para modular la transcripción de la molécula de ADN transcribible a un nivel deseado o en un patrón deseado cuando la construcción está integrada en el genoma de una célula de planta transgénica. En una modalidad, la molécula de ADN transcribible comprende una región de codificación de proteína de un gen y en otra modalidad la molécula de ADN transcribible comprende una región antisentido de un gen.

Genes de interés agronómico

Una molécula de ADN transcribible puede ser un gen de interés agronómico. Tal como se usa en la presente, el término "gen de interés agronómico" se refiere a una molécula de ADN transcribible que, cuando se expresa en un tejido de planta particular, célula o tipo de

célula, confiere una característica deseable. El producto de un gen de interés agronómico puede actuar dentro de la planta para causar un efecto sobre la morfología de la planta, fisiología, crecimiento, desarrollo, rendimiento, composición de grano, perfil nutricional, enfermedad o resistencia a plagas, tolerancia medioambiental o química, o puede actuar como un agente pesticida en la dieta de una plaga que se alimenta de la planta. En una modalidad de la invención, un elemento regulador de la invención está incorporado en una construcción de modo que el elemento regulador está unido de forma operativa a una molécula de ADN transcribible que es un gen de interés agronómico. En una planta transgénica que contiene tal construcción, la expresión del gen de interés agronómico puede conferir un rasgo agronómico beneficioso. Un rasgo agronómico beneficioso puede incluir, por ejemplo, de modo no taxativo, tolerancia a herbicidas, control de insectos, rendimiento modificado, resistencia a enfermedades, resistencia a patógenos, crecimiento y desarrollo vegetal modificado, contenido de almidón modificado, contenido de aceite modificado, contenido de ácido graso modificado, contenido de proteína modificada, maduración de la fruta modificada, nutrición animal y humana aumentada, producciones de biopolímeros, resistencia al estrés medioambiental, péptidos farmacéuticos, calidades de procesamiento mejoradas, sabor mejorado, utilidad de producción de semilla híbrida, producción de fibra mejorada y producción de biocombustible deseable.

Ejemplos de genes de interés agronómico conocidos en la técnica incluyen aquellos para resistencia a herbicidas (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,803,501; 6,448,476; 6,248,876; 6,225,114; 6,107,549; 5,866,775; 5,804,425; 5,633,435; y 5,463,175), rendimiento aumentado (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º USRE38,446; 6,716,474; 6,663,906; 6,476,295; 6,441,277; 6,423,828; 6,399,330; 6,372,211; 6,235,971; 6,222,098; y 5,716,837), control de insectos (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,809,078; 6,713,063; 6,686,452; 6,657,046; 6,645,497; 6,642,030; 6,639,054; 6,620,988; 6,593,293; 6,555,655; 6,538,109; 6,537,756; 6,521,442; 6,501,009; 6,468,523; 6,326,351; 6,313,378; 6,284,949; 6,281,016; 6,248,536; 6,242,241; 6,221,649; 6,177,615; 6,156,573; 6,153,814; 6,110,464; 6,093,695; 6,063,756; 6,063,597; 6,023,013; 5,959,091; 5,942,664; 5,942,658; 5,880,275; 5,763,245; y 5,763,241), resistencia a enfermedades fúngicas (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,653,280; 6,573,361; 6,506,962; 6,316,407; 6,215,048; 5,516,671; 5,773,696; 6,121,436; 6,316,407; y 6,506,962), resistencia a virus (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,617,496; 6,608,241; 6,015,940; 6,013,864; 5,850,023; y 5,304,730), resistencia a nemátodos (por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,228,992), resistencia e

enfermedad bacteriana (por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,516,671), desarrollo y crecimiento vegetal (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,723,897 y 6,518,488), producción de almidón (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,538,181; 6,538,179; 6,538,178; 5,750,876; 6,476,295), producción de aceites modificados (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,444,876; 6,426,447; y 6,380,462), producción alta de aceite (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,495,739; 5,608,149; 6,483,008; y 6,476,295), contenido de ácidos grasos modificado (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,828,475; 6,822,141; 6,770,465; 6,706,950; 6,660,849; 6,596,538; 6,589,767; 6,537,750; 6,489,461; y 6,459,018), producción alta de proteínas (por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,380,466), maduración de frutas (patente estadounidense n.º 5,512,466), nutrición animal y humana aumentada (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,723,837; 6,653,530; 6,5412,59; 5,985,605; y 6,171,640), biopolímeros (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º USRE37,543; 6,228,623; y 5,958,745, y 6,946,588), resistencia al estrés medioambiental (por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,072,103), péptidos farmacéuticos y péptidos segregantes (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,812,379; 6,774,283; 6,140,075; y 6,080,560), rasgos de procesamiento mejorados (por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,476,295), digestibilidad mejorada (por ejemplo, patente estadounidense n.º 6,531,648), rafinosa baja (por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,166,292), producción de enzima industrial (por ejemplo, patente estadounidense n.º 5,543,576), sabor mejorado (por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,011,199), fijación de nitrógeno (por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,229,114), producción de semillas híbridas (por ejemplo, patente estadounidense n.º 5,689,041), producción de fibra (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,576,818; 6,271,443; 5,981,834; y 5,869,720) y la producción de biocombustible (por ejemplo, patente estadounidense n.º 5,998,700).

De manera alternativa, un gen de interés agronómico puede afectar las características de planta antemencionadas o los fenotipos al codificar una molécula de ARN que hace que la modulación dirigida de la expresión génica de un gen endógeno, por ejemplo, mediante antisentido (ver, por ejemplo, la patente estadounidense 5,107,065); ARN inhibidor ("ARNi", que incluye la modulación de la expresión génica mediante mecanismos mediados por miARN, ARNip, ARNip de acción en trans, y ARNip graduado, por ejemplo, tal como se describe en las solicitudes publicadas U.S. 2006/0200878 y U.S. 2008/0066206, y en la solicitud de patente estadounidense 11/974,469); o mecanismos mediados por cosupresión. El ARN también podía ser una molécula de ARN catalítica (por ejemplo, una

ribozima o un ribointerruptor; (ver, por ejemplo, U.S. 2006/0200878) diseñado para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. Se conocen métodos en la técnica para construir e introducir construcciones en una célula de tal manera que la molécula de ADN transcribible se transcribe en una molécula que es capaz de provocar la supresión génica.

Marcadores seleccionables

Los transgenes de marcadores seleccionables también se pueden utilizar con los elementos reguladores de la invención. Tal como se usa en la presente, el término "transgén de marcador seleccionable" se refiere a cualquier molécula de ADN transcribible cuya expresión en una planta transgénica, tejido o célula o falta de esta, se puede analizar o calificar de alguna manera. Los genes marcadores seleccionables, y su selección asociada y técnicas de análisis, para utilizar en la práctica de la invención son conocidas en la técnica e incluyen, de modo no taxativo, moléculas de ADN transcribible que codifican la β -glucuronidasa (GUS), proteína verde fluorescente (GFP), proteínas que confieren resistencia antibiótica, y proteínas que confieren tolerancia herbicida. Se proporciona un ejemplo de un transgén de marcador seleccionable como la SEQ ID NO. 6.

Transformación celular

La invención también está dirigida a un método para producir células transformadas y plantas que comprenden uno o más elementos reguladores unidos de forma operativa a una molécula de ADN transcribible.

El término "transformación" se refiere a la introducción de una molécula de ADN en un hospedador receptor. Tal como se usa en la presente, el término "hospedador" se refiere a las bacterias, hongos o plantas, que incluyen cualquier célula, tejido, órgano o progenie de las bacterias, hongos o plantas. Los tejidos de las plantas y las células de interés particular incluyen protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, plántulas, embriones y polen.

Tal como se usa en la presente, el término "transformado" se refiere a una célula, tejido, órgano u organismo en el que se ha introducido una molécula de ADN externa, tal como una construcción. La molécula de ADN introducida se puede integrar en el ADN genómico de la célula, tejido, órgano u organismo receptor tal como la molécula de ADN introducida se hereda por progenie posterior. Una célula u organismo "transgénico" o "transformado" puede también incluir progenie de la célula u organismo y progenie producida a partir de un programa de cultivo que emplea tal organismo transgénico como un original en una cruce y exhibe un fenotipo alterado que resulta de la presencia de una molécula de ADN externa. La molécula de ADN introducida también puede ser introducida de forma transitoria en la

célula receptora de modo que la molécula de ADN introducida no es heredada por la progenie posterior. El término "transgénico" se refiere a una bacteria, hongo, o planta que contiene una o más moléculas de ADN heterólogas.

Existen muchos métodos conocidos por los expertos en la técnica para introducir moléculas de ADN en las células de las plantas. El proceso generalmente comprende las etapas de seleccionar una célula hospedadora adecuada, transformar la célula hospedadora con un vector y obtener la célula hospedadora transformada. Los métodos y materiales para transformar las células de las plantas al introducir una construcción de planta en un genoma de planta en la práctica de la presente invención pueden incluir cualquiera de los métodos conocidos y demostrados. Métodos adecuados incluyen, de modo no taxativo, infección bacteriana (por ejemplo, *Agrobacterium*), vectores BAC binarios, suministro directo de ADN (por ejemplo, mediante transformación mediada por PEG, absorción de ADN mediada por inhibición/desecación, electroporación, agitación con fibras de carburo de silicio, y aceleración de partículas recubiertas de ADN), edición de genes (por ejemplo, los sistemas CRISPR-Cas), entre otros.

Las células hospedadoras pueden ser cualquier célula u organismo, tal como una célula de planta, célula de alga, célula de hongo, hongos, célula bacteriana, o célula de insecto. En modalidades específicas, las células hospedadoras y las células transformadas pueden incluir células de plantas de cultivo.

Una planta transgénica posteriormente se puede regenerar de una célula de planta transgénica de la invención. Utilizando técnicas de cultivo convencional o autopolinización, la semilla se puede producir a partir de esta planta transgénica. Tal semilla, y la planta de progenie resultante de tal semilla, contendrá la molécula de ADN recombinante de la invención, y por lo tanto será transgénica.

Las plantas transgénicas de la invención pueden autopolinizarse para proporcionar semillas para las plantas transgénicas homocigotas de la invención (homocigotas para la molécula de ADN recombinante) o cruzarse con plantas no transgénicas o plantas transgénicas diferentes para proporcionar semillas para plantas transgénicas heterocigotas de la invención (heterocigotas para la molécula de ADN recombinante). En la presente se hace referencia a ambas plantas transgénicas homocigotas y heterocigotas como "plantas de progenie": Las plantas de progenie son plantas transgénicas que descienden de la planta transgénica original y que contienen la molécula de ADN recombinante de la invención. Las semillas producidas utilizando una planta transgénica de la invención se puede cultivar y utilizar para cosechar generaciones de plantas transgénicas, es decir, plantas de progenie

de la invención, que comprenden la construcción de la presente invención y que expresan un gen de interés agronómico. Las descripciones de los métodos de cultivo que se utilizan comúnmente para diferentes cultivos se pueden encontrar en uno de varios libros de referencia, ver, por ejemplo, Allard, *Principles of Plant Breeding*, John Wiley & Sons, NY, U. de CA, Davis, CA, 50-98 (1960); Simmonds, *Principles of Crop Improvement*, Longman, Inc., NY, 369-399 (1979); Sneep y Hendriksen, *Plant breeding Perspectives*, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, 2^a. Edición, Monograph, 16:249 (1987); Fehr, *Principles of Variety Development, Theory and Technique*, (Vol. 1) y *Crop Species Soybean* (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987).

Las plantas transformadas se pueden analizar en busca de la presencia del gen o genes de interés y el nivel de expresión y perfil conferido por los elementos reguladores de la invención. Los expertos en la técnica son conscientes de los numerosos métodos disponibles para los análisis de las plantas transformadas. Por ejemplo, los métodos para los análisis de las plantas incluyen, de modo no taxativo, análisis de transferencia Southern o análisis de transferencia Northern, enfoques basados en PCR, análisis bioquímicos, métodos de análisis fenotípicos, evaluaciones de campo y ensayos de inmunodiagnóstico. La expresión de una molécula de ADN transcribible se puede medir utilizando reactivos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los métodos descritos por el fabricante y los tiempos de ciclo de PCR se determinan utilizando la matriz de evaluación TaqMan®. De manera alternativa, los reactivos Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) y los métodos descritos por el fabricante se pueden utilizar para evaluar la expresión del transgén.

La invención también proporciona partes de una planta de la invención. Las partes de las plantas incluyen, de modo no taxativo, hojas, tallos, raíces, tubérculos, semillas, endospermo, óvulos y polen. Las partes de una planta de la invención pueden ser viables, no viables, regenerables y no regenerables. La invención también incluye y proporciona células de plantas transformadas que comprenden una molécula de ADN de la invención. Las células de plantas transformadas o transgénicas de la invención incluyen células de plantas regenerables y no regenerables.

La invención también proporciona un producto básico que se produce a partir de una planta transgénica o parte de esta que contiene la molécula de ADN recombinante de la invención. Los productos básicos de la invención contienen una cantidad detectable de ADN que comprende una secuencia de ADN que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ

ID NO:1-5 o 7. Tal como se usa en la presente, un “producto básico” se refiere a cualquier composición o producto que está compuesto por material derivado de una planta transgénica, semilla, célula vegetal o parte de planta que contiene la molécula de ADN recombinante de la invención. Los productos básicos incluyen de modo no taxativo semillas procesadas, granos, partes de la planta y alimento. Un producto básico de la invención contendrá una cantidad detectable de ADN correspondiente a la molécula de ADN recombinante de la invención. La detección de uno o más de este ADN en una muestra puede usarse para determinar el contenido o la fuente de producto básico. Puede usarse cualquier método estándar de detección de moléculas de ADN, incluyendo los métodos de detección descritos en la presente.

La invención puede ser más fácilmente entendida a través de la referencia con respecto a los siguientes ejemplos, que se proporcionan con fines ilustrativos, y no pretenden ser taxativos de la invención, a menos que se especifique. Los expertos en la técnica deben reconocer que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan las técnicas que los inventores descubrieron que funcionan correctamente en la práctica de la invención. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían apreciar que, a la luz de la presente divulgación, es posible realizar muchos cambios a las modalidades específicas divulgadas y aun así obtener un resultado similar sin alejarse del espíritu y el alcance de la invención, por lo tanto todo objeto establecido o mostrado se debe interpretar como ilustrativo y no en sentido taxativo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Identificación y clonación de elementos reguladores

Los elementos reguladores transcripcionales novedosos y un grupo de elemento de expresión regulador (EXP) se identificaron y clonaron a partir de ADN genómico de la especie monocotiledónea *Bouteloua gracilis*.

Mediante el uso de secuencias identificadas, un análisis bioinformático se llevó a cabo para identificar los elementos reguladores dentro del ADN ampliado. Por ejemplo, los análisis bioinformáticos se realizaron para identificar el sitio de inicio transcripcional (TSS) y cualquier bidireccionalidad, intrones, o secuencia de codificación corriente arriba presente en la secuencia. Los elementos reguladores se definieron, usando los resultados de estos análisis, dentro de la secuencia de ADN y los cebadores se diseñaron para amplificar los elementos reguladores. Las moléculas de ADN correspondientes para los elementos

reguladores se amplificaron utilizando las condiciones de reacción en cadena de la polimerasa estándar con cebadores que contienen los sitios de enzima de restricción única y el ADN genómico aislado de *Bouteloua gracilis*. Los fragmentos de ADN resultante se ligaron en los vectores de expresión de la planta base utilizando la digestión de enzima de restricción estándar de sitios de restricción compatibles y métodos de ligación de ADN.

Se pueden realizar análisis del elemento regulador TSS y uniones de corte y empalme de intrón/exón utilizando tejido de planta transformado. Brevemente, las plantas se transforman con los vectores de expresión de planta que comprenden los fragmentos de ADN clonado unidos de forma operativa a una molécula de ADN transcribible heteróloga. Luego, el sistema RACE 5' para la amplificación rápida de los extremos de ADNc, Versión 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, California 92008) se utiliza para confirmar el elemento regulador TSS y las uniones de corte y empalme de intrón/exón mediante el análisis de la secuencia de ADN de las transcripciones de ARNm producidas.

La secuencia de ADN que codifica el grupo de elemento de expresión reguladora transcripcional *Bouteloua gracilis* o la secuencia EXP derivada de un gen de ubiquitina putativo, que comprende un elemento promotor, unido de forma operativa a un elemento líder, unido de forma operativa a un elemento de intrón, se presenta en la Tabla 1, junto con su promotor, líder e intrón correspondiente. La UTR 3' correspondiente al gen de ubiquitina putativo *Bouteloua gracilis* también se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupo, promotor, líder, intrón, y UTR 3' aislada de elemento de expresión reguladora transcripcional de *Bouteloua gracilis*.

Descripción	SEQ ID NO:	Descripción y/o elementos reguladores de EXP unidos en la dirección 5' → 3' (SEQ ID NO):
EXP-BOUgr.Ubq:2	1	EXP: P-BOUgr.Ubq:2 (SEQ ID NO:2); L-BOUgr.Ubq:1 (SEQ ID NO:3); I-BOUgr.Ubq:1 (SEQ ID NO:4)
P-BOUgr.Ubq:2	2	Promotor
L-BOUgr.Ubq:1	3	Líder
I-BOUgr.Ubq:1	4	Intrón
T-BOUgr.Ubq:1	5	UTR 3'

Ejemplo 2

Análisis de elementos reguladores que accionan la expresión GUS en plantas de maíz transformado de forma estable

Las plantas de maíz se transformaron con un vector, específicamente un vector de expresión de planta que contiene un elemento regulador de prueba que acciona la expresión del transgén β -glucuronidasa (GUS). Las plantas resultantes se analizaron para la expresión de proteína GUS, para evaluar el efecto del elemento regulador seleccionado en la expresión.

Las plantas de maíz se transformaron con una construcción de expresión GUS de planta. Los elementos reguladores se clonaron en un vector de expresión de planta base utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. El vector de expresión de planta resultante contenía una región de borde izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.borde izquierdo), un primer casete de selección de transgén utilizado para la selección de células de planta transformadas que confiere resistencia al glifosato herbicida; un segundo casete de transgén para evaluar la actividad del elemento regulador, que comprendía EXP-BOUgr.Ubq:2 (SEQ ID NO:1) unido de forma operativa 5' a una secuencia de codificación sintética diseñada para la expresión en una célula de planta que codifica la β -glucuronidasa (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1, SEQ ID NO:6) que contiene un intrón procesable derivado del gen ST-LS1 específico del tejido inducible por luz de la papa (número de

registro Genbank: X04753), unido de forma operativa 5' a una región de terminación 3', T-BOUgr.Ubq:1 (SEQ ID NO:5); y una región de borde derecho de *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.borde derecho).

Las células de plantas de maíz se transformaron utilizando la construcción del vector de transformación binario descrito anteriormente mediante transformación mediada por *Agrobacterium*, como se conoce en la técnica. Las células de plantas transformadas resultantes se indujeron para formar plantas de maíz enteras.

El análisis GUS histoquímico se utilizó para el análisis de expresión cualitativa y cuantitativa de las plantas transformadas. Se incubaron secciones de tejido enteras con solución de tinción GUS X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-glucurónido) (1 miligramo/mililitro) durante un plazo de tiempo apropiado, se enjuagaron y se inspeccionaron visualmente en busca de coloración azul. La actividad GUS se determinó cualitativamente por inspección visual directa o inspección bajo un microscopio utilizando órganos y tejidos de plantas seleccionadas.

Para el análisis cuantitativo de la expresión de GUS, la proteína total se extrajo de los tejidos seleccionados de plantas de maíz transformadas. Un microgramo de proteína total se utilizó con el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) en un volumen de reacción total de 50 microlitros. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), es fluorescente al máximo a pH elevado, donde el grupo hidroxilo se ioniza. La adición de una solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente. La fluorescencia se midió con excitación a 365 nm, emisión a 445 nm utilizando un Fluoromax-3 con Lector Micromax, con ancho abierto establecido a excitación 2 nm y emisión 3nm. Los valores se proporcionan en unidades de GUS nmol/hora/mg de proteína total.

Los siguientes tejidos fueron muestreados para ver la expresión de GUS en la generación R₀. hoja y raíz en etapa V4; hoja y raíz en etapa V7; flor/antera en etapa VT, hoja, y raíz; mazorca y seda en etapa R1; etapa R3 21 días después de la polinización (DAP) del embrión de semilla y endospermo. La Tabla 2 muestra la expresión de GUS cuantitativa media para cada uno de los tejidos muestreados llevados por el casete de transgén de elemento regulador que comprende EXP-BOUgr.Ubq:2 (SEQ ID NO:1) y T-BOUgr.Ubq:1 (SEQ ID NO:5).

Tabla 2. Expresión GUS cuantitativa promedio en plantas de maíz transformadas de forma estable accionada por elementos reguladores derivados de *Bouteloua gracilis*.

Etapas	Órgano	Promedio	Err Est.
V4	Hoja	2552.55	895.34
	Raíz	6476.58	1383.15
V7	Hoja	3622.05	1091.84
	Raíz	3953.61	1121.73
VT	Flores, anteras	9207.81	1587.9
	Hoja	8795.48	1795.25
	Raíz	4123.47	1207.1
R1	Mazorca, seda	5994.73	1548.68
R3	Semilla, 21DAP, Em	10338.8	1592.33
	Semilla, 21DAP, En	11249.6	746.08

Tal como se puede ver en la Tabla 2, el nivel más alto de expresión impartida por los elementos reguladores se observó en embriones de semillas R3, 21 DAP y endospermo. La expresión elevada también se observó en la flor, anteras y hoja de la etapa VT. La expresión de la hoja pareció aumentar en las hojas de la etapa V4 a V7. La expresión de la raíz pareció disminuir de la etapa V4 a V7 y luego permaneció similar de la etapa V7 a VT.

Ejemplo 3

Elementos potenciadores derivados de los elementos reguladores

Los potenciadores derivan del elemento promotor presentado como la SEQ ID NO:2. El elemento potenciador puede comprender uno o más elementos reguladores *cis* que cuando están unidos de forma operativa 5' o 3' a un elemento promotor, o unidos de forma operativa 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están unidos de forma operativa a un promotor, pueden aumentar o modular los niveles de expresión de una molécula de ADN transcribible, o proporcionar expresión de una molécula de ADN transcribible en un tipo de célula específica u órgano de planta o en un punto de tiempo particular en el desarrollo o ritmo circadiano. Los potenciadores se elaboran al quitar la caja TATA o elementos funcionalmente similares y cualquier secuencia corriente abajo de los

promotores que permiten que la transcripción se inicie del promotor presentado como la SEQ ID NO:2 o fragmentos de este.

La caja TATA en los promotores de plantas no se conserva tanto como en algunos otros organismos eucariotas. Por lo tanto, para definir un fragmento como un potenciador, primero se debe identificar el sitio de inicio transcripcional (TSS) del gen, donde la UTR 5' se transcribe primero. Por ejemplo, el elemento regulador transcripcional, EXP-BOUgr.Ubq:2 (SEQ ID NO:1) comprende el elemento promotor, P-BOUgr.Ubq:2 (SEQ ID NO:2), unido de forma operativa a la UTR 5' UTR o elemento líder, L-BOUgr.Ubq:1 (SEQ ID NO:3), que está unido de forma operativa al elemento de intrón, I-BOUgr.Ubq:1 (SEQ ID NO:4). Dentro del elemento promotor de 1095 pb, P-BOUgr.Ubq:2 (SEQ ID NO:2), el elemento tipo TATA de núcleo putativo se encuentra dentro de los nucleótidos 1046 a 1053. Un fragmento potenciador derivado del P-BOUgr.Ubq:2 podría comprender los nucleótidos 1 a 1045 de la SEQ ID NO:2, lo que da como resultado la secuencia presentada como la SEQ ID NO:7 (E-BOUgr.Ubq). Los potenciadores derivados del promotor, P-BOUgr.Ubq:2 (SEQ ID NO:2), pueden comprender además fragmentos más pequeños de E-BOUgr.Ubq (SEQ ID NO:7). La eficacia de los elementos potenciadores derivados del promotor, P-BOUgr.Ubq:2 se determina empíricamente al construir un elemento regulador transcripcional quimérico que comprende un potenciador derivado del promotor, P-BOUgr.Ubq:2, que está unido de forma operativa a un promotor y líder y es utilizado para accionar la expresión de una molécula de ADN transcribible tal como GUS en ensayo de planta estable o temporal.

Un refinamiento adicional del elemento potenciador puede requerirse y se valida empíricamente. Además, la posición del elemento potenciador respecto a otros elementos dentro de un elemento regulador transcripcional quimérico también está determinada empíricamente, dado que el orden de cada elemento dentro del elemento regulador transcripcional quimérico puede impartir diferentes efectos, dependiendo de las posiciones relativas de cada elemento. Algunos elementos promotores tendrán múltiples cajas TATA o elementos similares a la caja TATA y potencialmente múltiples sitios de inicio de transcripción. En esas circunstancias, puede ser necesario primero identificar donde está ubicado el primer TSS y luego comenzar a diseñar potenciadores utilizando el primer TSS para evitar que ocurra el inicio potencial de transcripción dentro de un elemento potenciador putativo.

Los elementos potenciadores, derivados del elemento promotor presentados como la SEQ ID NO:2 se clonan utilizando métodos conocidos en la técnica por estar unidos de forma

operativa 5' o 3' a un elemento promotor, o por estar unidos de forma operativa 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están unidos de forma operativa a un promotor. De manera alternativa, los elementos potenciadores se pueden clonar, utilizando métodos conocidos en la técnica, para proporcionar un elemento potenciador más grande que comprende dos o más copias del potenciador y clonarse utilizando métodos conocidos en la técnica por estar unidos de forma operativa 5' o 3' a un elemento promotor, o estar unidos de forma operativa 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están unidos de forma operativa a un promotor que produce un elemento regulador transcripcional quimérico. Los elementos potenciadores también se pueden clonar utilizando métodos conocidos en la técnica por estar unidos de forma operativa 5' a un elemento promotor derivado de un organismo de género diferente, o unido de forma operativa 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales derivados de organismos de otros géneros que están unidos de forma operativa a un promotor derivado de un organismo del mismo género o de género diferente, lo que da como resultado un elemento regulador transcripcional quimérico. Un vector de transformación de planta de expresión GUS se puede construir utilizando métodos conocidos en la técnica similares a la construcción descrita en el Ejemplo 2 en el que los vectores de expresión de planta resultante contienen una región de borde izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.borde izquierdo), un primer casete de selección de transgén para la selección de células de plantas transformadas que confiere resistencia al glifosato de herbicida; y un segundo casete de transgén para evaluar el elemento potenciador que comprende el elemento potenciador unido de forma operativa 5' o 3' a un elemento promotor o unido de forma operativa 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que por su parte están unidos de forma operativa a un promotor que está unido de forma operativa 5' a un elemento líder, unido de forma operativa 5' a un elemento intrón, unido de forma operativa a una secuencia de codificación para la β -glucuronidasa (GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1, SEQ ID NO:6) que contiene un intrón procesable derivado del gen ST-LS1 específico del tejido inducible por luz de la papa (número de registro Genbank: X04753), unido de forma operativa a una región de terminación 3' del gen tipo proteína de transferencia de lípido *Oryza sativa* (T-Os.LTP:1, SEQ ID NO:8); y una región de borde derecho de *A. tumefaciens* (B-AGRtu.borde derecho). Los plásmidos resultantes se utilizan para transformar las plantas de maíz u otras plantas del género monocotiledónea mediante los métodos descritos anteriormente. De manera alternativa, las células de protoplastos derivadas del maíz u otras plantas del género monocotiledónea se transforman utilizando métodos conocidos en la técnica para realizar

los ensayos temporales.

La expresión de GUS accionada mediante un elemento regulador que comprende uno o más potenciadores es evaluada en ensayos de plantas estables o temporales para determinar los efectos del elemento potenciador en la expresión de una molécula de ADN transcribible. Las modificaciones a uno o más elementos potenciadores o el duplicado de uno o más elementos potenciadores se pueden realizar basándose en experimentos empíricos y la regulación de la expresión génica resultante que se observa utilizando cada composición de elemento regulador. Alterar las posiciones relativas de uno o más potenciadores en los elementos reguladores o reguladores quiméricos resultantes puede afectar la actividad transcripcional o especificidad del elemento regulador o regulador quimérico y se determina de forma empírica para identificar los mejores potenciadores para el perfil de expresión del transgén deseado dentro de la planta de maíz o una planta de otro género.

Ejemplo 4

Análisis de potenciamiento de intrón de la actividad de GUS utilizando protoplastos derivados de plantas

Un intrón se selecciona basándose en la experimentación y la comparación con un control de vector de expresión sin intrón para seleccionar de forma empírica un intrón, y en la configuración dentro de la disposición del elemento de ADN de transferencia (ADN-T) de vector para la expresión óptima de un transgén. Por ejemplo, en la expresión de un gen de resistencia a los herbicidas, tal como CP4, que confiere tolerancia al glifosato, es deseable tener expresión transgénica dentro de los tejidos reproductivos así como los tejidos vegetativos, para evitar la pérdida de rendimiento cuando se aplica el herbicida. Un intrón en este caso se seleccionaría por su capacidad, cuando está unido de forma operativa a un promotor constitutivo, para potenciar la expresión del transgén que confiere resistencia al herbicida, particularmente dentro de los tejidos y las células reproductivas de la planta transgénica, proporcionando de este modo tolerancia vegetativa y reproductiva a la planta transgénica cuando se le pulveriza con el herbicida. En la mayoría de los genes de ubiquitina, la UTR 5' comprende un líder, que tiene una secuencia de intrones incrustada dentro de esta. Los elementos reguladores derivados de tales genes por lo tanto son sometidos a ensayo utilizando toda la UTR 5' que comprende el promotor, líder e intrón. Para lograr diferentes perfiles de expresión o para modular el nivel de expresión transgénica, el intrón de tal elemento regulador se puede quitar o sustituir con un intrón heterólogo.

El intrón I-BOUgr.Ubq:1, presentado en la presente como la SEQ ID NO:4, se identifica utilizando cóntigos de ADN genómico en comparación con agrupaciones de etiquetas de secuencia expresada o cóntigos de ADNc para identificar las secuencias de exones e intrones dentro del ADN genómico. Además, la UTR 5' o secuencia líder también se utiliza para definir la unión de corte y empalme de intrón/exón de uno o más intrones en condiciones donde la secuencia génica codifica una secuencia líder que es interrumpida por uno o más intrones. Los intrones se clonan utilizando métodos conocidos en la técnica en un vector de transformación de planta para que estén unidos de forma operativa 3' a un elemento regulador y fragmento líder y unidos de forma operativa 5' a ya sea un segundo fragmento líder o a secuencias de codificación.

Tal como se menciona anteriormente, puede ser preferible evitar utilizar la secuencia de nucleótidos AT o el nucleótido A justo antes del extremo 5' del sitio de corte y empalme (GT) y el nucleótido G o la secuencia de nucleótidos TGm respectivamente justo después del extremo 3' del sitio de corte y empalme (AG) para eliminar el potencial de que se formen codones de inicio no deseados durante el procesamiento del ARN mensajero en la transcripción final. La secuencia de ADN alrededor de los sitios de unión de corte de empalme de extremo 5' o 3' del intrón por lo tanto se puede modificar.

Los intrones se evalúan para un efecto potenciador a través de la capacidad de aumentar la expresión en un ensayo de planta estable transformado. Para un ensayo temporal de potenciamiento de intrón, se construye un vector de planta base utilizando métodos conocidos en la técnica. El intrón se clona en un vector de planta base similar a aquel descrito en el Ejemplo 2 que comprende un casete de expresión que comprende un promotor constitutivo tal como el líder y promotor del virus de mosaico de la coliflor potenciado, P+L-CaMV.35S-enh (SEQ ID NO:9), 5' unido de forma operativa a un elemento de intrón de prueba (por ejemplo, la SEQ ID NO:4), unido de forma operativa a una secuencia de codificación para GUS que posee un intrón procesable (GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1, SEQ ID NO:6), unido de forma operativa a la Nopalina sintasa UTR 3' de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO:10); y un segundo casete de expresión para la selección de las células de planta transformada. Las células de plantas de maíz se transforman utilizando la construcción del vector de transformación binario descrito anteriormente mediante transformación mediada por *Agrobacterium*, como se conoce en la técnica. Las células de plantas transformadas resultantes se indujeron para formar plantas de maíz enteras. Los transformantes de cantidad de copias baja o de copia individual se seleccionan para la comparación con las plantas transformadas de cantidad

de copias baja o copias individuales, transformadas con un vector de transformación de plantas idéntico al vector de prueba pero sin el intrón de prueba para determinar si el intrón de prueba proporciona un efecto de potenciamiento mediado por intrón.

El intrón I-BOUgr.Ubq:1, presentado en la presente como la SEQ ID NO:4, se puede modificar en una cantidad de maneras, tal como eliminando fragmentos dentro de la secuencia del intrón, que puede reducir la expresión o el duplicado de fragmentos con el intrón que puede potenciar la expresión. Además, las secuencias de ADN dentro del intrón que pueden afectar la especificidad de la expresión, ya sea a los tipos de células particulares o a los tejidos y órganos, se pueden duplicar o alterar o eliminar para afectar la expresión y los patrones de expresión del transgén. Además, el intrón proporcionado en la presente se puede modificar para quitar cualesquiera codones de inicio potenciales (ATG) que puedan hacer que las transcripciones no intencionales se expresen a partir de intrones cortados y empalmados de forma inapropiada como proteínas diferentes, más largas o truncadas. Una vez que el intrón se ha evaluado de forma empírica, o se ha alterado basándose en experimentación, el intrón se utiliza para potenciar la expresión de un transgén en plantas transformadas de forma estable que pueden ser de planta monocotiledónea o dicotiledónea de cualquier género, siempre y cuando el intrón proporcione potenciamiento del transgén. El intrón también se puede utilizar para potenciar la expresión en otros organismos, tales como algas, hongos o células animales, siempre y cuando el intrón proporcione potenciamiento o atenuación o especificidad de expresión del transgén al que está unido de forma operativa.

Una vez se ilustraron y describieron los principios de la presente invención, debería ser evidente para los expertos en la técnica que la invención puede ser modificada en su disposición y detalles sin apartarse de dichos principios. Se reivindica que todas las modificaciones se encuentran dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones. Todas las publicaciones y documentos de patentes publicadas que se citan en la presente se incorporan mediante esta referencia en esta en la misma medida que si cada publicación o solicitud de patente individual se indicara específica e individualmente como incorporada mediante esta referencia.