ELEMENTOS REGULADORES VEGETALES Y SUS USOS

REFERENCIA A SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense N.º 62/306,790, presentada el 11 de marzo de 2016, que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

El listado de secuencias contenido en el archivo de nombre «MONS417WO-sequence_listing», el cual tiene 29.4 KB (tamaño medido en Microsoft Windows®) y se creó el 6 de marzo de 2017, se presenta mediante la presente por presentación electrónica y se incorpora a la presente por referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se relaciona con el campo de la biología molecular de plantas y la ingeniería genética de plantas. De forma más específica, la invención se refiere a moléculas de ADN útiles para modular la expresión génica en plantas.

ANTECEDENTES

Los elementos reguladores son elementos genéticos que regulan la actividad génica por medio de la modulación de la transcripción de una molécula de ADN transcribible ligada funcionalmente. Dichos elementos pueden incluir promotores, líderes, intrones y regiones no traducidas en dirección a 3´ y son útiles en el campo de la biología molecular de plantas y la ingeniería genética de plantas.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona nuevos elementos reguladores génicos para uso en plantas. La invención proporciona también construcciones de ADN que comprenden los elementos reguladores. La presente invención proporciona además células vegetales, plantas y semillas transgénicas que comprenden los elementos reguladores. En una modalidad, los elementos reguladores están ligados funcionalmente 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, en modalidades específicas, puede definirse como ligada funcionalmente a una molécula de ADN transcribible heteróloga. La presente invención también proporciona métodos para producir y utilizar los elementos reguladores, las

construcciones de ADN que comprenden los elementos reguladores y las células vegetales, plantas y semillas transgénicas que comprenden los elementos reguladores ligados funcionalmente a una molécula de ADN transcribible.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos alrededor de 85 por ciento de identidad secuencial con cualquiera de las SEQ ID NO: 13-15; (b) una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 13-15; y (c) un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 13-15, donde el fragmento tiene actividad reguladora génica; donde la secuencia está ligada funcionalmente a una molécula de ADN transcribible heteróloga. Una «molécula de ADN transcribible heteróloga» significa que la molécula de ADN transcribible es heteróloga con respecto a la secuencia de polinucleótidos a la cual está funcionalmente ligada. 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 secuencial con la secuencia de ADN de cualquiera de las SEQ ID NO: 13-15. En modalidades específicas, la secuencia de ADN comprende un elemento regulador. En algunas modalidades, el elemento regulador comprende un promotor. En otras modalidades adicionales, la molécula de ADN transcribible heteróloga comprende un gen de interés agronómico, tal como un gen capaz de proporciona resistencia herbicida en plantas, o un gen capaz de proporcionar resistencia a plagas vegetales en plantas. En otras modalidades adicionales, la invención proporciona una construcción que comprende una molécula de ADN recombinante proporcionada en la presente.

En otro aspecto, en la presente se proporcionan células vegetales transgénicas que comprenden una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos alrededor de 85 por ciento de identidad secuencial con cualquiera de las SEQ ID NO: 13-15; (b) una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 13-15; y (c) un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 13-15, donde el fragmento tiene actividad reguladora génica; donde la secuencia de ADN está ligada funcionalmente a una molécula de ADN transcribible heteróloga. En determinadas modalidades, la célula vegetal transgénica es una célula de planta monocotiledónea. En otras modalidades, la célula vegetal transgénica es una célula de planta monocotiledónea o una célula de planta dicotiledónea.

En otro aspecto adicional, en la en la presente se proporciona además una planta transgénica, o parte de la misma, que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en: a) una secuencia con al menos 85 por ciento de identidad secuencial con cualquiera de las SEQ ID NO: 13-15; b) una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 13-15; y c) un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 13-15, donde el fragmento tiene actividad reguladora génica; donde la secuencia está ligada funcionalmente 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. También se proporciona en la presente una semilla transgénica que comprende la molécula de ADN recombinante que produce dicha planta transgénica cuando se cultiva.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un producto primario que comprende obtener una planta transgénica o parte de la misma que contiene una molécula de ADN recombinante de la invención y producir el producto primario a partir de la misma. En una modalidad, el producto primario es semillas, granos, partes de planta, aceites y sémola procesados.

En otro aspecto adicional, 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 vegetal con la molécula de ADN recombinante de la invención para producir una célula vegetal transformada y regenerar una planta transgénica a partir de la célula vegetal transformada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de ADN de un grupo de elementos reguladores de la expresión (EXP) que comprende un promotor derivado de un gen de la proteína ferredoxina 2 (Fe2) putativa de *Cucumis melo* ligado funcionalmente en dirección a 5´ a su líder natural.

La SEQ ID NO: 2 es una secuencia promotora derivada de un gen de la proteína ferredoxina 2 (Fe2) putativa de *Cucumis melo*.

La SEQ ID NO: 3 es una secuencia líder derivada de un gen de la proteína ferredoxina 2 (Fe2) putativa de *Cucumis melo*.

La SEQ ID NO: 4 es una secuencia de ADN de un EXP que comprende un promotor derivado de un gen 13 de la proteína de unión a la clorofila a-b de *Cucumis melo* ligado funcionalmente en dirección a 5´ a su líder natural.

La SEQ ID NO: 5 es una secuencia promotora derivada de un gen 13 de la proteína de unión

a la clorofila a-b de *Cucumis melo*.

La SEQ ID NO: 6 es una secuencia líder derivada de un gen 13 de la proteína de unión a la clorofila a-b de *Cucumis melo*.

La SEQ ID NO: 7 es una secuencia de ADN de un EXP que comprende un promotor derivado de un gen similar a 24 de la proteína con dedos de zinc de secuencia B de *Cucumis melo* ligado funcionalmente en dirección a 5´ a su líder natural.

La SEQ ID NO: 8 es una secuencia promotora derivada de un gen similar a 24 de la proteína con dedos de zinc de la secuencia B de *Cucumis melo*.

La SEQ ID NO: 9 es una secuencia líder derivada de un gen similar a 24 de la proteína con dedos de zinc de la secuencia B de *Cucumis melo*.

La SEQ ID NO: 10 es una secuencia de ADN de un EXP que comprende un promotor derivado de un gen b2 de la proteína de complejo captador de luz de *Medicago truncatula* ligado funcionalmente en dirección a 5´ a su líder natural.

La SEQ ID NO: 11 es una secuencia promotora derivada de un gen b2 de la proteína de complejo captador de luz de *Medicago truncatula*.

La SEQ ID NO: 12 es una secuencia líder derivada de un gen b2 de la proteína de complejo captador de luz de *Medicago truncatula*.

La SEQ ID NO: 13 es una secuencia de ADN de un EXP que comprende un promotor derivado de un gen de precursor de cloroplasto del fotosistema II de *Medicago truncatula* ligado funcionalmente en dirección a 5´ a su líder natural.

La SEQ ID NO: 14 es una secuencia promotora derivada de un gen de precursor de cloroplasto del fotosistema II de *Medicago truncatula*.

La SEQ ID NO: 15 es una secuencia líder secuencia promotora derivada de un gen de precursor de cloroplasto del fotosistema II de *Medicago truncatula*.

La SEQ ID NO: 16 es una secuencia potenciadora derivada del promotor del gen b2 de la proteína de complejo captador de luz de *Medicago truncatula*.

La SEQ ID NO: 17 es una secuencia codificante para β-glucuronidasa (GUS) con un intrón procesable.

La SEQ ID NO: 18 es una secuencia UTR (siglas en inglés para «región no traducida») en dirección a 3´ derivada del gen E6 de *Gossypium barbadense*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona moléculas de ADN que tienen actividad reguladora génica en plantas. Las secuencias de nucleótidos de estas moléculas de ADN se proporcionan como las SEQ ID NO: 13-15. Estas moléculas de ADN son capaces de afectar la expresión de una molécula de ADN transcribible ligada funcionalmente en tejidos vegetales y, por lo tanto, de regular la expresión génica de un transgén ligado funcionalmente en plantas transgénicas. La invención también proporciona métodos para modificarlas, producirlas y usarlas. La invención también proporciona composiciones que incluyen células vegetales, plantas, partes de planta y semillas transgénicas que contienen la molécula de ADN recombinante de la invención y métodos para prepararlas y usarlas.

Las siguientes definiciones y métodos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos que se indique lo contrario, los términos se entenderán de acuerdo con el uso convencional que le dan los expertos en la técnica relevante.

Moléculas de ADN

Como se usa en la presente, el término «ADN» o «molécula de ADN» hace referencia 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´ (anterior) hacia el extremo 3´ (posterior). 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 utilizada en la presente corresponde a la del Título 37 del Código de Reglamentos Federales de los Estados Unidos § 1.822, y establecida en la Norma ST.25 de la OMPI (1998), Apéndice 2, Tablas 1 y 3.

Como se usa 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 consta de al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí, una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que se desvía de la secuencia de ADN que existe en la naturaleza o una molécula de ADN que se ha incorporado al ADN de una célula hospedadora por medio de transformación genética o edición de genes.

Como se usa en la presente, el término «identidad secuencial» hace referencia a la medida en que dos secuencias de polinucleótidos alineadas de forma óptima o dos secuencias de polipéptidos alineadas de forma óptima son idénticas. Una alineación de secuencias óptima

se crea al alinear manualmente dos secuencias, por ejemplo, una secuencia de referencia y otra secuencia, para maximizar la cantidad de coincidencias de nucleótidos en la alineación de secuencias con las inserciones, supresiones o espacios de nucleótidos internos adecuadas. Como se usa en la presente, el término «secuencia de referencia» se refiere a la secuencia de ADN proporcionada como una secuencia de ADN proporcionada como SEQ ID NO: 13-15.

Como se usa en la presente, el término «porcentaje de identidad secuencial» o «porcentaje de identidad» o «% de identidad» es la fracción de identidad multiplicada por 100. La «fracción de identidad» para una secuencia alineada de forma óptima con una secuencia de referencia es la cantidad de coincidencias 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 la longitud completa de la secuencia de referencia entera. Por lo tanto, una modalidad de la invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia que, cuando se alinea de forma óptima con una secuencia de referencia, proporcionada en la presente como SEQ ID NO: 13-15, tiene al menos alrededor de 85 por ciento de identidad, al menos alrededor de 86 por ciento de identidad, al menos alrededor 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 de alrededor de 97 por ciento de identidad, al menos alrededor de 98, al menos de alrededor de 99 por ciento de identidad o al menos alrededor de 100 con la secuencia de referencia.

Elementos reguladores

Los elementos reguladores tales como promotores, líderes (también conocidos como UTR en dirección a 5'), potenciadores, intrones y regiones de terminación de la transcripción (o UTR en dirección a 3´) son parte integral en la expresión general de los genes en las células vivas. El término «elemento regulador», como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ADN que tiene actividad reguladora génica. El término «actividad reguladora génica», como se usa en la presente, se refiere a la capacidad para afectar la expresión de una molécula de ADN transcribible ligada funcionalmente, por ejemplo, al afectar la transcripción y/o traducción de la molécula de ADN transcribible ligada funcionalmente. Los elementos reguladores, tales como promotores, líderes, potenciadores, intrones y UTR en dirección a 3´ que funcionan en

plantas son, por lo tanto, útiles para modificar fenotipos vegetales a través de ingeniería genética.

Como se usa en la presente, una secuencia de «grupo de elemento regulador de la expresión» o «EXP» puede hacer referencia a un grupo de elementos reguladores ligados funcionalmente tales como potenciadores, promotores, líderes e intrones. Por consiguiente, un grupo de elemento regulador de la expresión puede comprender, por ejemplo, un promotor ligado funcionalmente en dirección a 5´ a una secuencia líder. Los EXP útiles en la práctica de la presente invención incluyen 1, 4, 7, 10 y 13.

Los elementos reguladores pueden caracterizarse por su patrón de expresión génica, por ejemplo, efectos positivos y/o negativos tales como expresión constitutiva o temporal, espacial, relacionada con el desarrollo, tisular, ambiental, fisiológica, patológica, relacionada con el ciclo celular y/o expresión sensible químicamente, y cualquier combinación de estas, así como también por sus indicaciones cuantitativas o cualitativas. Como se usa en la presente, un «patrón de expresión génica» es cualquier patrón de transcripción de una molécula de ADN ligada funcionalmente en una molécula de ARN transcrita. La molécula de ARN transcrita puede traducirse para producir una molécula proteica o puede proporcionar una molécula de ARN no codificante o reguladora de otro tipo, tal como ARN bicatenario (ARNbc), un ARN de transferencia (ARNt), un ARN ribosómico (ARNr), un microARN (miARN) y similares.

Como se usa en la presente, el término «expresión proteica» es cualquier patrón de traducción de una molécula de ARN transcrita en una molécula proteica. La expresión proteica puede caracterizarse por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo o morfológicas, así como también por las indicaciones cuantitativas o cualitativas.

Un promotor es útil como elemento regulador para modular la expresión de una molécula de ADN transcribible ligada funcionalmente. Como se usa en la presente, el término «promotor» hace referencia en general a una molécula de ADN que participa en el reconocimiento y unión de ARN polimerasa II y otras proteínas, tales como factores de transcripción que actúan en trans, para iniciar la transcripción. Se puede aislar inicialmente un promotor de la región no traducida en dirección a 5´ (UTR en dirección a 5´) de una copia genómica de un gen. Alternativamente, los promotores pueden ser moléculas de ADN producidas o manipuladas de forma sintética. Los promotores también pueden ser quiméricos. Los promotores quiméricos se producen a través de la fusión de dos o más moléculas de ADN heterólogas. Los promotores útiles en la práctica de la presente invención incluyen elementos promotores comprendidos dentro de la SEQ ID NO: 14, o sus fragmentos o variantes. En modalidades

específicas de la invención, las moléculas de ADN reivindicadas y cualquiera de sus variantes o derivados descritos en la presente, se definen además por comprender actividad promotora, *es decir*, son capaces de actuar como un promotor en una célula hospedadora, tal como una planta transgénica. En modalidades específicas adicionales, se puede definir que un fragmento exhibe actividad promotora que posee la molécula promotora de partida de la cual deriva, o un fragmento puede comprender un «promotor mínimo» que proporciona un nivel basal de transcripción y consta de una secuencia TATA, otros motivos de sitio de unión de factor de transcripción conocidos, o secuencia de ADN equivalente para el reconocimiento y unión del complejo de ARN polimerasa II para la iniciación de la transcripción.

En una modalidad, se proporcionan fragmentos de una secuencia promotora descrita en la presente. Los fragmentos de promotor pueden comprender actividad promotora, tal como se describió anteriormente, y pueden ser útiles solos o en combinación con otros promotores o fragmentos de promotor, tal como en la construcción de promotores quiméricos o en combinación con otros EXP o fragmentos de EXP. 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, la invención proporciona fragmentos de cualquiera de las SEQ ID NO: 13-15, que tienen la actividad de la secuencia de longitud completa. Los métodos para producir dichos fragmentos a partir de una molécula promotora de partida se conocen en la técnica.

Las composiciones derivadas de cualquiera de los elementos promotores comprendidos dentro de la SEQ ID NO: 14, tales como supresiones internas o en dirección a 5´, por ejemplo, se pueden producir utilizado métodos conocidos en la técnica para mejorar o alterar la expresión, incluida la extracción de elementos que tienen efectos positivos o negativos sobre la expresión; elementos duplicantes que tienen efectos positivos o negativos sobre la expresión; y/o elementos duplicantes o extractores que tienen efectos sobre la expresión específicos para el tejido o célula. Las composiciones derivadas de cualquiera de los elementos promotores comprendidos dentro de la SEQ ID NO: 14 que constan de supresiones en dirección a 3´ en las que se extrae el elemento de secuencia TATA o una secuencia equivalente a la misma y una secuencia posterior, se pueden utilizar, por ejemplo, para

producir elementos potenciadores. Además, se pueden hacer supresiones para extraer cualquier elemento que tenga efectos sobre la expresión positivos o negativos; específicos para el tejido; específicos para la célula; o específicos para un momento (tal como, pero sin limitarse a, el ritmo circadiano). Cualquiera de los elementos promotores comprendidos dentro de la SEQ ID NO: 14 y fragmentos o potenciadores derivados de estos se pueden utilizar para hacer composiciones de elementos reguladores transcripcionales quiméricos.

De acuerdo con la invención, un promotor o fragmento promotor se puede analizar para determinar la presencia de elementos promotores conocidos, *es decir*, características de secuencia de ADN, tales como secuencia TATA y otros motivos de sitio de unión de factor de transcripción conocidos. Un experto en la técnica puede utilizar la identificación de dichos elementos promotores conocidos para diseñar variantes del promotor que tienen un patrón de expresión similar al del promotor original.

Como se usa en la presente, el término «líder» hace referencia a una molécula de ADN aislada de la región no traducida en dirección a 5´ (UTR en dirección a 5´) de un gen y se define en general como un segmento de nucleótidos entre el sitio de inicio transcripcional (TSS, por sus siglas en inglés) y el sitio de inicio de la secuencia codificante de la proteína. Alternativamente, los líderes pueden ser elementos de ADN producidos o manipulados de forma sintética. Un líder se puede utilizar como un elemento regulador en dirección a 5´ para modular la expresión de una molécula de ADN transcribible ligada funcionalmente. Las moléculas líderes se pueden utilizar con un promotor heterólogo o con su promotor natural. Los líderes útiles en la práctica de la presente invención incluyen la SEQ ID NO: 15 o cualquiera de los elementos líderes comprendidos dentro de la SEQ ID NO: 13 o sus fragmentos o variantes. En modalidades específicas, dichas secuencias de ADN pueden definirse como capaces de actuar como líder en una célula hospedadora, incluida, por ejemplo, una célula vegetal transgénica. En una modalidad, dichas secuencias se decodifican como poseedoras de actividad líder.

Las secuencias líderes (también denominadas UTR en dirección a 5´) presentadas como la SEQ ID NO: 15 o cualquiera de los elementos líderes comprendidos dentro de la SEQ ID NO: 13 pueden comprender elementos reguladores, o pueden adoptar estructuras secundarias que pueden tener un efecto sobre la transcripción o traducción de una molécula de ADN transcribible ligada funcionalmente. Las secuencias líderes presentadas como la SEQ ID NO: 15 o cualquiera de los elementos líderes comprendidos dentro de la SEQ ID NO: 13 se pueden usar de acuerdo con la invención para producir elementos reguladores quiméricos que afectan la transcripción o traducción de una molécula de ADN transcribible ligada funcionalmente.

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 general como una región empalmada durante el procesamiento del ARN mensajero (ARNm) antes de la traducción. Alternativamente, un intrón puede ser un elemento de ADN producido o manipulado de forma sintética. Un intrón puede contener elementos potenciadores que llevan a cabo la transcripción de genes ligados funcionalmente. Se puede utilizar un intrón como elemento regulador para modular la expresión de una molécula de ADN transcribible ligada funcionalmente. Una construcción puede comprender un intrón y el intrón puede o no ser heterólogo con respecto a la molécula de ADN transcribible. Los ejemplos de intrones en la técnica incluyen el intrón de la actina en el arroz y el intrón HSP70 en el maíz.

En plantas, la inclusión de algunos intrones en construcciones génicas conduce a ARNm aumentado y acumulación proteica en relación con construcciones que carecen del intrón. Este efecto se ha denominado «potenciación mediada por intrón» (IME, por sus siglas en inglés) de la expresión génica. Se han identificado intrones conocidos por estimular la expresión en plantas en genes de maíz (*por ejemplo*, tubA1, Adh1, Sh1 y Ubi1), en genes de arroz (*por ejemplo*, tpi) y en genes de plantas dicotiledóneas tales como los de petunia (por ejemplo, rbcS), papa (*por ejemplo*, st-ls1) y de *Arabidopsis thaliana* (*por ejemplo*, ubq3 y pat1). Se ha demostrado que las supresiones o mutaciones dentro de los sitios de empalme de un intrón reducen la expresión génica, lo que indica que el empalme puede ser necesario la IME. Sin embargo, se ha exhibido IME en plantas dicotiledóneas mediante mutaciones puntuales dentro de los sitios de empalme del gen pat1 de *A. thaliana*. Se ha demostrado que múltiples usos del mismo intrón en una planta exhiben desventajas. En tales casos, es necesario tener una colección de elementos de control básicos para la construcción de elementos de ADN recombinante adecuados.

Como se usa en la presente, los términos «molécula de terminación de la transcripción en dirección a 3´», «región no traducida en dirección a 3´» o «UTR en dirección a 3´» hacen referencia a una molécula de ADN que se utiliza durante la transcripción para la región no traducida de la porción en dirección a 3´de una molécula de ARNm. La región no traducida en dirección a 3´ de una molécula de ARNm se puede generar mediante escisión específica y poliadenilación en dirección a 3´, también conocida como cola de poliA. Una UTR en dirección a 3´ puede estar ligada funcionalmente a y ubicada posteriormente con respecto a una molécula de ADN transcribible y puede incluir una señal de poliadenilación y otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción, procesamiento de ARNm y expresión génica. Se cree que las colas de poliA tienen una función en la estabilidad del ARNm y en la iniciación de la traducción. Los ejemplos de moléculas de terminación de la transcripción en dirección

a 3´en la técnica son la región en dirección a 3´ de nopalina sintasa; región en dirección a 3´ de hsp17 de trigo, región en dirección a 3´de la subunidad pequeña de rubisco de frijol, región en dirección a 3´ de E6 de algodón y la UTR en dirección a 3´ de coixina.

Las UTR en dirección a 3´ típicamente tienen un uso beneficioso para la expresión recombinante de moléculas de ADN específicas. Una UTR en dirección a 3´ débil tiene el potencial de generar una translectura, que puede afectar la expresión de la molécula de ADN ubicada en los casetes de expresión aledaños. El control adecuado de la terminación de la transcripción puede evitar la translectura en secuencias de ADN (por ejemplo, otros casetes de expresión) ubicadas posteriormente y puede permitir además la recirculación eficiente de la ARN polimerasa para mejorar la expresión génica. La terminación eficiente de la transcripción (liberación de ARN Polimerasa II del ADN) es un prerrequisito para la reiniciación de la transcripción y, por lo tanto, afecta directamente el nivel de transcrito global. Después de la terminación de la transcripción, el ARNm maduro se libera del sitio de síntesis y la plantilla se transporta al citoplasma. Los ARNm eucariontes se acumulan como formas poli(A) *in vivo*, dificultando la detección de sitios de terminación transcripcionales mediante métodos convencionales. Sin embargo, la predicción de UTR en dirección a 3´ funcionales y eficientes mediante métodos bioinformáticos es difícil debido a que no existen secuencias de ADN conservadas que permitirían una predicción fácil de una UTR en dirección a 3´ eficaz.

Desde un punto de vista práctico, es típicamente beneficioso que una UTR en dirección a 3´ usada en un casete de expresión posea las siguientes características. La UTR en dirección a 3´ debería ser capaz de terminar la transcripción del transgén de forma eficiente y eficaz y prevenir la translectura del transcrito en cualquier secuencia de ADN aledaña, que puede comprender otro casete de expresión, como en el caso de múltiples casetes de expresión que residen en un ADN de transferencia (ADNT), o en el ADN cromosómico aledaño en el cual se ha insertado el ADNT. La UTR en dirección a 3´ no debería causar una reducción en la actividad transcripcional impartida por el promotor, líder, potenciadores e intrones que se utilizan para impulsar la expresión de la molécula de ADN. En la biotecnología vegetal, la UTR en dirección a 3´ a menudo se utiliza para cebar reacciones de amplificación de ARN transcrito de forma inversa extraído de la planta transformada y se usa para: (1) evaluar la actividad transcripcional o expresión del casete de expresión luego de integrarlo en el cromosoma vegetal; (2) evaluar la cantidad de copias de inserciones dentro del ADN vegetal; y (3) evaluar la cigosidad de la semilla resultante tras el cultivo. La UTR en dirección a 3´ también se utiliza en reacciones de amplificación de ADN extraído de la planta transformada para caracterizar la integridad del casete insertado.

Como se usa en la presente, el término «potenciador» o «elemento potenciador» hace referencia a un elemento regulador que actúa en *cis*, es decir, un elemento en *cis*, que confiere un aspecto del patrón de expresión global, pero que generalmente es insuficiente solo para impulsar la transcripción de una molécula de ADN transcribible ligada funcionalmente. A diferencia de los promotores, los elementos potenciadores generalmente no incluyen un sitio de inicio transcripcional (TSS) o secuencia TATA o secuencia de ADN equivalente. Un promotor o fragmento de promotor puede comprender naturalmente uno o más elementos potenciadores que afectan la transcripción de una secuencia de ADN ligada funcionalmente. Un elemento potenciador también puede fusionarse con un promotor para producir un elemento en *cis* de promotor quimérico, que confiere un aspecto de la modulación global de la expresión génica. Un ejemplo de un elemento potenciador derivado del promotor del gen del precursor b2 de la proteína del complejo captador de luz de *Medicago truncatula* se proporciona como SEQ ID NO: 16.

Se cree que muchos elementos potenciadores promotores se unen a proteínas de unión a ADN y/o afectan la topología del ADN, produciendo conformaciones locales que permiten o restringen selectivamente al acceso de la ARN polimerasa a la plantilla de ADN o que facilitan la abertura selectiva de la doble hélice en el sitio de iniciación transcripcional. Un elemento potenciador puede funcionar para unirse a factores de transcripción que regulan la transcripción. Algunos elementos potenciadores se unen a más de un factor de transcripción y los factores de transcripción pueden interactuar con diferentes afinidades con más de un dominio potenciador. Los elementos potenciadores se pueden identificar mediante varias técnicas, incluido el análisis de supresión, es decir, suprimir uno o más nucleótidos desde el extremo en 5´ o interno hasta un promotor; análisis de proteína de unión a ADN utilizando obtención de la impronta de DNasa I, interferencia por metilación, ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética, obtención de la impronta genómica *in vivo* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) mediada por ligadura y otros ensayos convencionales; o mediante análisis de similitud de secuencia de ADN utilizando motivos de elemento en *cis* conocidos o elementos potenciadores como secuencia objetivo o motivo objetivo con métodos de comparación de secuencia de ADN convencionales, tales 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 a partir de elementos reguladores que incluyen dichos elementos, y se pueden sintetizar con nucleótidos flanqueadores adicionales que contienen sitios de enzima de restricción útiles para facilitar la posterior manipulación.

Por lo tanto, la invención abarca el diseño, la construcción y el uso de elementos potenciadores de acuerdo con los métodos descritos en la presente para modular la expresión de moléculas de ADN transcribibles ligadas funcionalmente.

Como se usa en la presente, el término «quimérico» hace referencia a una molécula de ADN simple 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 encontrarían normalmente en dicha configuración, es decir, fusionadas entre sí. La molécula de ADN quimérico es, por lo tanto, una nueva molécula de ADN que no se encuentra de otra forma normalmente en la naturaleza. Como se usa en la presente, el término «promotor quimérico» hace referencia a un promotor producido mediante dicha manipulación de moléculas de ADN. Un promotor quimérico puede combinar dos o más fragmentos de ADN, por ejemplo, la fusión de un promotor con un elemento potenciador. Por lo tanto, la presente invención abarca el diseño, la construcción y el uso de promotores quiméricos de acuerdo con los métodos descritos en la presente para modular la expresión de moléculas de ADN transcribibles ligadas funcionalmente.

Los elementos reguladores quiméricos se pueden diseñar para comprender diversos elementos constituyentes que pueden ligarse funcionalmente mediante diversos métodos conocidos en la técnica, tales como digestión y ligadura por enzima de restricción, clonación independiente de ligadura, ensamblaje modular de productos de PCR durante la amplificación o síntesis química directa del elemento regulador, así como otros métodos conocidos en la técnica. Los diversos elementos reguladores quiméricos resultantes pueden comprender los mismos, o variantes de los mismos elementos constituyentes, pero difieren en la secuencia de ADN o secuencias de ADN que comprenden la secuencia o secuencias de ADN conectoras que permiten que las partes constituyentes estén ligadas funcionalmente. En la invención, una secuencia de ADN proporcionada como SEQ ID NO: 13-15 puede proporcionar una secuencia de referencia de elemento regulador, donde los elementos constituyentes que comprenden la secuencia de referencia pueden enlazarse mediante métodos conocidos en la técnica y pueden comprender sustituciones, supresiones y/o inserciones de uno o más nucleótidos o mutaciones que se producen naturalmente en la transformación bacteriana y de células vegetales.

Como se usa en la presente, el término «variante» hace referencia a una segunda molécula de ADN, tal como un elemento regulador, que es en composición similar, pero no idéntico, a la primera molécula de ADN, y donde la segunda molécula de ADN conserva aún la funcionalidad general, *es decir,* el mismo patrón de expresión o similar, por ejemplo, a través

de una actividad transcripcional más o menos equivalente, a la de la primera molécula de ADN. Una variante puede ser una versión más corta o truncada de la primera molécula de ADN y/o una versión alterada de la secuencia de la primera molécula de ADN, tal como una con diferentes sitios de enzima de restricción y/o supresiones, sustituciones y/o inserciones internas. Una «variante» también puede abarcar un elemento regulador que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, supresión y/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 translacional que la molécula reguladora genitora correspondiente. Las «variantes» de elemento regulador también abarcarán variantes que surgen de mutaciones que se producen naturalmente en la transformación bacteriana y de células vegetales. En la presente invención, una secuencia de polinucleótidos proporcionada como SEQ ID NO: 13-15 se puede utilizar para crear variantes que son similares en composición, pero no idénticas, a la secuencia de ADN del elemento regulador original, mientras aún conservan la funcionalidad general, es decir, el mismo patrón de expresión o similar, del elemento regulador original. La producción de dichas variantes de la invención está dentro de la experiencia en la técnica en virtud de la descripción y está dentro del alcance de la invención.

Se pretende que la referencia en esta solicitud a una «molécula de ADN aislada», o un término o frase equivalente, signifique que la molécula de ADN es una que está presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no dentro de su ambiente natural. Por ejemplo, los elementos de ácido nucléico tal como una secuencia de codificación, secuencia de intrón, secuencia líder no traducida, secuencia promotora, secuencia de terminación transcipcional, y similares, que se encuentran naturalmente dentro del ADN del genoma de un organismo no se consideran «aislados» mientras que el elemento está dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentrol del genoma en la que se encuentra naturalmente. Sin embargo, cada uno de estos elementos, y subpartes de estos elementos, estaría «aislado» dentro del alcance de la presente descripción mientras el elemento no está dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en la se encuentra que naturalmente. A los efectos de la presente descripción, cualquier secuencia nucleótida transgénica, es decir, la secuencia nucleótida del ADN insertada en el genoma de las células de una planta o bacteria, o presente en un vector extracromosómico, se consideraría una secuencia nucleótida aislada ya sea si está presente dentro del plásmido o estructura similar utilizado para transformar las células, dentro del genoma de la planta o bacteria, o presente en cantidades detectables en tejidos, progenie, muestas biológicas o productos primarios derivados de la planta o bacteria.

La eficacia de las modificaciones, duplicaciones o supresiones descritas en la presente sobre

los aspectos de expresión deseados de un transgén específico pueden evaluarse empíricamente en ensayos con plantas estables y transitorios, tales como los descritos en los ejemplos de trabajo en la presente, con el fin de validar los resultados, que pueden variar dependiendo de los cambios hechos y del objetivo del cambio en la molécula de ADN de partida.

Construcciones

Como se usa en la presente, el término «construcción» significa cualquier molécula de ADN recombinante tal como un plásmido, cósmido, virus, fago o molécula de ADN o ARN lineal o circular, derivada de cualquier fuente, capaz de integración genómica o repetición autónoma, que comprende una molécula de ADN donde al menos una molécula de ADN se ha ligado a otra molécula de ADN de forma funcionalmente operativa, es decir, está ligada funcionalmente. Como se usa en la presente, el término «vector» significa cualquier construcción que se puede utilizar con el fin de la transformación, es decir, la introducción de ADN o ARN heterólogo en una célula hospedadora. Una construcción típicamente incluye uno o más casetes de expresión. Como se usa en la presente, un «casete de expresión» hace referencia a una molécula de ADN que comprende al menos una molécula de ADN transcribible ligada funcionalmente a uno o más elementos reguladores, típicamente al menos un promotor y una UTR en dirección a 3´.

Como se usa en la presente, el término «ligado/a funcionalmente» hace referencia a una primera molécula de ADN unida a una segunda molécula de ADN, donde la primera y segunda moléculas de ADN están dispuestas de tal 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 molécula de ADN contigua simple y pueden o no ser adyacentes. Por ejemplo, un promotor está ligado funcionalmente 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 ligado funcionalmente a la secuencia de ADN cuando es capaz de afectar la transcripción o traducción de la secuencia de ADN.

Las construcciones de la invención pueden proporcionarse, en una modalidad, como construcciones de borde de plásmido inductor de tumores (Ti) dobles que tienen regiones de borde derecho (RB o AGRtu.RB, por sus siglas en inglés) y borde izquierdo (LB o AGRtu.LB, por sus siglas en inglés) del plásmido Ti aisladas a partir de *Agrobacterium tumefaciens* que comprende un ADNT que, junto con las moléculas de transferencia proporcionadas por las células de *A. tumefaciens*, permiten la integración del ADNT en el genoma de una célula vegetal (*véase*, por ejemplo, la patente estadounidense 6.603.061). Las construcciones

también pueden contener los segmentos de ADN de esqueleto plasmídico que proporcionan la función de replicación y selección antibiótica en células bacterianas, *por ejemplo*, un origen de replicación de *Escherichia coli* tal como ori322, un origen de replicación de rango de hospedador amplio tal como oriV o oriRi, y una región codificante para un marcador seleccionable tal como Spec/Strp que codifica para Tn7 aminoglicósido adeniltransferasa (*aadA*) que confiere resistencia a espectinomicina o estreptomicina, o un gen marcador seleccionable de gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación vegetal, la cepa bacteriana hospedadora es a menudo ABI, C58 o LBA4404 de *A. tumefaciens*; sin embargo, otras cepas conocidas para los expertos en la técnica de la transformación vegetal pueden funcionar en la invención.

Los métodos se conocen en la técnica para ensamblar e introducir construcciones en una célula de tal forma que la molécula de ADN transcribible se transcriba en una molécula de ARNm funcional que se traduce y expresa como una proteína. Para la práctica de la invención, las composiciones y métodos convencionales para preparar y utilizar construcciones y células hospedadoras son conocidos para un experto en la técnica. Los vectores típicamente útiles para la expresión de ácidos nucleicos en plantas superiores se conocen en la técnica e incluyen vectores derivados del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* y el vector de control de transferencia pCaMVCN.

Se pueden incluir diversos elementos reguladores en una construcción, incluidos los proporcionados en la presente. Cualquiera de dichos elementos reguladores puede proporcionarse en combinación con otros elementos reguladores. Dichas 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 ligado funcionalmente a una molécula de ADN transcribible ligada funcionalmente a una UTR en dirección a 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 ligado a un líder en dirección a 5´no traducido heterólogo tal como uno derivado de un gen de proteína de choque térmico. Alternativamente, un líder de la invención puede estar ligado funcionalmente a un promotor heterólogo tal como el promotor del transcrito del virus del mosaico de la coliflor 35S.

Los casetes de expresión también pueden incluir una secuencia codificante de péptido de tránsito que codifica para un péptido que es útil para la orientación subcelular de una proteína ligada funcionalmente, particularmente hacia un cloroplasto, leucoplasto u otro organelo

plastídico; mitocondria; peroxisoma; vacuola; o una ubicación extracelular. Muchas proteínas ubicadas en el cloroplasto se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se orientan hacia el cloroplasto mediante un péptido de tránsito al cloroplasto (CTP, por sus siglas en inglés). Los ejemplos de dichas proteínas de cloroplasto incluyen, pero no se limitan a, aquellas asociadas con la subunidad pequeña (SSU, por sus siglas en inglés) de ribulosa-1,5,-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidorreductasa, la proteína I y la proteína II del complejo captador de luz, tiorredoxina F y enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS, por sus siglas en inglés). Los péptidos de tránsito al cloroplasto se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 7.193.133. Se ha demostrado que las proteínas que no son del cloroplasto se pueden orientar hacia el cloroplasto mediante la expresión de un CTP heterólogo ligado funcionalmente al transgén que codifica para una proteína que no es del cloroplasto.

Moléculas de ADN transcribibles

Como se usa en la presente, el término «molécula de ADN transcribible» hace referencia a cualquier molécula de ADN capaz de transcribirse en una molécula de ARN, incluidas, pero sin limitarse a, aquellas que tienen secuencias codificantes de proteína y aquellas que producen moléculas de ARN que tienen secuencias útiles para la expresión génica. El tipo de molécula de ADN puede incluir, pero no se limita a, 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 mensajero no codificante de un gen, o una molécula de ADN que codifica para una versión de un transgén artificial, sintética o de otra forma modificada. Los ejemplos de moléculas de ADN transcribibles para incorporación en las construcciones de la invención incluyen, *por ejemplo*, moléculas de ADN o genes de una especie distinta de la especie en la cual se incorpora la molécula de ADN o genes que se originan de la misma, o están presentes en, la misma especie, pero se incorporan en células receptoras mediante métodos de ingeniería genética en lugar de las técnicas de cultivo clásicas.

Un «transgén» hace referencia a una molécula de ADN transcribible heteróloga con respecto a una célula hospedadora al menos en relación con su ubicación en el genoma de la célula hospedadora y/o una molécula de ADN transcribible artificialmente incorporada en un genoma de célula hospedadora en la generación actual o cualquiera anterior de la célula.

Un elemento regulador, tal como un promotor de la invención, puede ligarse funcionalmente a una molécula de ADN transcribible que es heteróloga con respecto al elemento regulador. 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, las dos moléculas de ADN pueden derivar de diferentes especies y/o las dos moléculas de ADN pueden derivar de genes diferentes, *por ejemplo,* genes diferentes de la misma especie o los mismos genes de especies diferentes. Un elemento regulador es, por lo tanto, heterólogo con respecto a una molécula de ADN transcribible ligada funcionalmente si dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza, *es decir*, la molécula de ADN transcribible no existe de forma natural ligada funcionalmente al elemento regulador.

La molécula de ADN transcribible pueden ser generalmente cualquier molécula de ADN de la cual se desea la expresión de un transcrito. Dicha expresión de un transcrito puede resultar en la traducción de la molécula de ARNm resultante, y, por lo tanto, en la expresión proteica. Alternativamente, por ejemplo, una molécula de ADN transcribible puede diseñarse para provocar en última instancia la expresión reducida de un gen o proteína específica. En una modalidad, esto se puede lograr utilizando una molécula de ADN transcribible que se orienta en la dirección antisentido. Un experto en la técnica está familiarizado con el uso de dicha tecnología antisentido. Cualquier gen se puede regular de forma negativa de esta manera, y, en otra modalidad, se puede diseñar una molécula de ADN transcribible para la supresión de un gen específico a través de la expresión de una molécula de ARNbc, 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, tales como los proporcionados como SEQ ID NO: 13-15, ligado funcionalmente a una molécula de ADN transcribible heteróloga con el fin de modular la transcripción de la molécula de ADN transcribible en un nivel deseado o en un patrón deseado cuando la construcción se integra en el genoma de una célula vegetal transgénica. En una modalidad, la molécula de ADN transcribible comprende una región codificante de proteína de un gen y en otra modalidad la molécula de ADN transcribible comprende una región no codificante de un gen.

Genes de interés agronómico

Una molécula de ADN transcribible puede ser un gen de interés agronómico. Como se usa en la presente, el término «gen de interés agronómico» hace referencia a una molécula de ADN transcribible que, cuando se expresa en un tejido, célula o tipo celular vegetal específico, confiere una característica deseable. El producto de un gen de interés agronómico puede actuar dentro de la planta con el fin de provocar un efecto sobre la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo, rendimiento, composición del grano, perfil nutricional, resistencia a enfermedad o plaga y/o tolerancia ambiental o química de una planta o puede actuar como

un agente pesticida en la alimentación de una plaga que se alimenta con la planta. En una modalidad de la invención, un elemento regulador de la invención se incorpora en una construcción de forma que el elemento regulador esté ligado funcionalmente a una molécula de ADN transcribible que es un gen de interés agronómico. En una planta transgénica que contiene dicha construcción, la expresión del gen de interés agronómico puede conferir un rasgo agronómico beneficioso. Un rasgo agronómico beneficioso puede incluir, por ejemplo, pero no se limita a, tolerancia herbicida, control de insectos, rendimiento modificado, resistencia a enfermedad, resistencia a patógeno, crecimiento y desarrollo vegetal modificado, contenido de almidón modificado, contenido de aceite modificado, contenido de ácidos grasos modificado, contenido de proteínas modificado, maduración de frutos modificada, nutrición animal y humana potenciada, producciones de biopolímeros, resistencia al estrés ambiental, péptidos farmacéuticos, cualidades de procesamiento mejoradas, sabor mejorado, utilidad de producción semillas híbridas, producción de fibra mejorada y producción de biocombustible deseable.

Los ejemplos de genes de interés agronómico conocidos en la técnica incluyen aquellos para resistencia herbicida (patentes estadounidenses números 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 (patentes estadounidenses números 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 (patentes estadounidenses números 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 (patentes estadounidenses números 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 (patentes estadounidenses números 6.617.496; 6.608.241; 6.015.940; 6.013.864; 5.850.023; y 5.304.730), resistencia a nematodos (patente estadounidense número 6.228.992), resistencia a enfermedades bacterianas patente estadounidense número 5.516.671), crecimiento y desarrollo vegetal (patentes estadounidenses números 6.723.897 y 6.518.488), producción de almidón (patentes estadounidenses números 6.538.181; 6.538.179; 6.538.178; 5.750.876; 6.476.295), producción de aceites modificados (patentes estadounidenses números 6.444.876; 6.426.447; y 6.380.462), producción aceite elevada (patentes estadounidenses números 6.495.739; 5.608.149; 6.483.008; y 6.476.295), contenido de ácidos grasos modificado

(patentes estadounidenses números 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 de proteína elevada (patente estadounidense número 6.380.466), maduración de frutos (patente estadounidense número 5.512.466), nutrición animal y humana potenciada (patentes estadounidenses números 6.723.837; 6.653.530; 6.5412.59; 5.985.605; y 6.171.640), biopolímeros (patentes estadounidenses números USRE37.543; 6.228.623; y 5.958.745 y 6.946.588), resistencia al estrés ambiental (patente estadounidense número 6.072.103), péptidos farmacéuticos y péptidos secretables (patentes estadounidenses números 6.812.379; 6.774.283; 6.140.075; y 6.080.560), rasgos de procesamiento mejorados (patente estadounidense número 6.476.295), digestibilidad mejorada (patente estadounidense número 6.531.648) rafinosa baja (patente estadounidense número 6.166.292), producción de enzima industrial (patente estadounidense número 5.543.576), sabor mejorado (patente estadounidense número 6.011.199), fijación de nitrógeno (patente estadounidense número 5.229.114), producción de semilla híbrida (patente estadounidense número 5.689.041), producción de fibra (patentes estadounidenses números 6.576.818; 6.271.443; 5.981.834; y 5.869.720) y producción de biocombustible (patente estadounidense números 5.998.700).

Alternativamente, un gen de interés agronómico puede afectar las características o fenotipos vegetales mencionados anteriormente al codificar para una molécula de ARN que provoca la modulación orientada de la expresión génica de un gen endógeno, por ejemplo, mediante antisentido (véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 5.107.065); ARN inhibidor («ARNi», incluida la modulación de la expresión mediante mecanismos mediados por miARN, ARNip, ARNip que actúa en trans y ARNs desfasado, por ejemplo, tal como se describe en las solicitudes estadounidenses 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 podría ser también una molécula de ARN catalítica (por ejemplo, una ribozima o un ribointerruptor; *véase*, por ejemplo, U.S. 2006/0200878) genomanipulada para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. Los métodos se conocen en la técnica para construir e introducir construcciones en una célula de tal forma que la molécula de ADN transcribible se transcriba en una molécula capaz de provocar la supresión génica.

Marcadores seleccionables

Los transgenes marcadores seleccionables también se pueden utilizar con los elementos reguladores de la invención. Como se usa en la presente, el término «transgén marcador seleccionable» se refiere a cualquier molécula de ADN transcribible cuya expresión en una planta, tejido o célula transgénico, o la falta de la misma, se puede barrer o puntuar de alguna

forma. Los genes marcadores seleccionables y sus técnicas de selección y barrido asociadas, para uso en la práctica de la invención se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, moléculas de ADN transcribibles que codifican para β-glucuronidasa (GUS), proteína verde fluorescente (GFP), proteínas que confieren resistencia a antibióticos y proteínas que confieren tolerancia a herbicidas. Un ejemplo de un transgén marcador seleccionable se proporciona como SEQ ID N.º:17.

Transformación celular

La invención también se refiere a un método para producir células transformadas que comprenden uno o más elementos reguladores ligados funcionalmente a una molécula de ADN transcribible.

El término «transformación» hace referencia a la introducción de una molécula de ADN en un hospedador receptor. Como se usa en la presente, el término «hospedador» hace referencia a bacterias, hongos o plantas, incluidas cualesquiera células, tejidos, órganos o progenie de las bacterias, hongos o plantas. Los tejidos y células vegetales de interés particular incluyen protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, plantones, embriones y polen.

Como se usa en la presente, el término «transformado/a» hace referencia a una célula, tejido, órgano u organismo en el cual se ha introducido una molécula de ADN extraña, tal como una construcción. La molécula de ADN introducida puede integrarse en el ADN genómica de la célula, tejido, órgano u organismo receptor de forma tal que la progenie posterior hereda la molécula de ADN introducida. Una célula u organismo «transgénica/o» o «transformada/o» también puede incluir progenie de la célula u organismo y progenie producida a partir de un programa de cultivo que emplea dicho organismo transgénico como genitor en un cruzamiento y exhibe un fenotipo alterado resultante de la presencia de la molécula de ADN extraña. La molécula de ADN introducida también puede introducirse transitoriamente en la célula receptora de forma tal que la progenie posterior hereda la molécula de ADN introducida. El término «transgénica/o» hace referencia 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 células vegetales. 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 células vegetales mediante la introducción de una construcción vegetal en un genoma vegetal en la práctica de la presente invención pueden incluir cualesquiera de los métodos conocidos y demostrados. Los métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a, infección bacteriana

(*por ejemplo*, *Agrobacterium*), vectores BAC binarios, administración directa de ADN (*por ejemplo*, mediante transformación mediada por PEG, absorción de ADN mediada por desecación/inhibición, electroporación, agitación con fibras de carburo de silicio y aceleración de partículas recubiertas con ADN), edición génica (*por ejemplo*, sistemas CRISPR-Cas), entre otros.

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

Una planta transgénica posteriormente se puede regenerar a partir de una célula vegetal transgénica de la invención. Mediante el uso de técnicas de cultivo o autopolinización convencionales, se puede producir una semilla a partir de esta planta transgénica. Dicha semilla, y la planta de progenie resultante cultivada a partir de dicha semilla, contendrán la molécula de ADN recombinante de la invención y, por lo tanto, serán transgénicas.

Las plantas transgénicas de la invención se pueden autopolinizar para proporcionar una semilla para plantas transgénicas homocigóticas de la invención (homocigóticas para la molécula de ADN recombinante) o cruzar con plantas no transgénicas o plantas transgénicas diferentes para proporcionar una semilla para plantas transgénicas heterocigóticas de la invención (heterocigóticas para la molécula de ADN recombinante). Las plantas transgénicas homocigóticas y heterocigóticas se denominan en la presente «plantas de progenie». Las plantas de progenie son plantas transgénicas que descienden de la planta transgénica original y contienen la molécula de ADN recombinante de la invención. Las semillas producidas utilizando una planta transgénica de la invención se pueden cosechar y utilizarse para cultivar generaciones de plantas transgénicas, *es decir*, plantas de progenie de la invención, que comprenden la construcción de la presente invención y expresan un gen de interés agronómico. Se pueden encontrar descripciones de los métodos de cultivo que se utilizan comúnmente para diferentes cultivos en uno de diversos libros de referencia, véase, por ejemplo, Allard, *Principles of Plant Breeding*, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98 (1960); Simmonds, *Principles of Crop Improvement*, Longman, Inc., NY, 369-399 (1979); Sneep and Hendriksen, *Plant breeding Perspectives*, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, 2da Edición, Monograph, 16:249 (1987); Fehr, *Principles of Variety Development*, *Theory and Technique,* (Tomo 1) y *Crop Species Soybean* (Tomo 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987).

Las plantas transformadas se pueden analizar para determinar la presencia del gen o genes de interés y el nivel y/o perfil de expresión conferido por los elementos reguladores de la invención. Los expertos en la técnica conocen los numerosos métodos disponibles para el análisis de plantas transformadas. Por ejemplo, los métodos para el análisis de plantas incluyen, pero no se limitan a, transferencias Southern o transferencias Northern, estrategias basadas en PCR, análisis bioquímicos, métodos de barrido fenotípico, evaluaciones de campo y ensayos inmunodiagnósticos. La expresión de una molécula de ADN transcribible puede medirse utilizando reactivos y métodos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) tales como los describe el fabricante y tiempos de ciclo de PCR determinados utilizando la Matriz de Prueba TaqMan®. Alternativamente, se pueden utilizar los reactivos y métodos Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) tales como los describe el fabricante para evaluar la expresión transgénica.

La invención también proporciona partes de una planta de la invención. Los partes de planta incluyen, pero no se limitan a, hojas, tallos, raíces, tubérculos, semillas, endospermo, óvulo y polen. Las partes de planta de la invención pueden ser viables, no viables, regenerables y/o no regenerables. La invención también incluye y proporciona células vegetales transformadas que comprenden una molécula de ADN de la invención. Las células vegetales transformadas o transgénicas de la invención incluyen células vegetales regenerables y/o no regenerables.

La invención también proporciona un producto primario que se produce a partir de una planta transgénica o parte de la misma que contiene l molécula de ADN recombinante de la invención. Los productos primarios 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: 13-15. Como se usa en la presente, un «producto primario» hace referencia a cualquier composición o producto que comprende material derivado de una planta, semilla, célula vegetal o parte de planta transgénica que contiene la molécula de ADN recombinante de la invención. Los productos primarios incluyen, pero no se limitan a, semillas, granos, partes de planta y sémola procesados. Un producto primario 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 se puede utilizar para determinar el contenido o fuente del producto primario. Cualquier método de detección estándar para moléculas de ADN puede utilizarse, incluidos métodos de detección descritos en la presente.

La invención podrá entenderse más fácilmente a través de la referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan con fines ilustrativos y que no pretenden ser limitantes de la invención, a menos que se especifique lo contrario. Los expertos en la técnica entenderán

que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan las técnicas que los inventores descubrieron que funcionan correctamente en la práctica de la invención. No obstante, los expertos en la técnica, en función de la presente descripción, deberán apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las modalidades específicas que se describen y aun así obtener un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención, por lo tanto, todo objeto establecido o exhibido en los dibujos que acompañan se debe interpretar como ilustrativo y no en sentido limitante.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Identificación y clonación de elementos reguladores

Se identificaron y clonaron nuevos elementos reguladores y grupos de elementos reguladores de expresión (EXP) a partir del ADN genómico de las especies dicotiledóneas *Cucumis melo* (WSH-39-1070AN) y *Medicago truncatula*.

Los elementos reguladores transcripcionales se seleccionaron con base en datos de micromatrices registradas y públicas derivadas de experimentos de perfil transcripcional llevados a cabo en soja (*Glycine max*) y *Arabidopsis*, así como también en búsquedas basadas en la homología utilizando secuencias de dicotiledóneas conocidas como consultas con respecto a secuencias registradas de *Cucumis melo* y registradas y públicas de *Medicago truncatula*.

Mediante el uso de las secuencias identificadas se llevó a cabo un análisis bioinformático para identificar elementos reguladores dentro del ADN amplificado. Por ejemplo, se llevó a cabo un análisis bioinformático para identificar el sitio de inicio transcripcional (TSS) y cualquier bidireccionalidad, intrones o secuencia codificante anterior presente en la secuencia. Mediante el uso de los resultados de este análisis, los elementos reguladores se definieron dentro de las secuencias de ADN y se diseñaron cebadores para amplificar los elementos reguladores. La molécula de ADN correspondiente para cada elemento regulador se amplificó utilizando condiciones de reacción en cadena de la polimerasa estándares con cebadores que contenían sitios de enzima de restricción únicos y ADN genómico aislado de *Cucumis melo* y *Medicago truncatula*. Los fragmentos de ADN resultante se ligaron en vectores de expresión vegetal base utilizando digestión de enzima de restricción estándar de sitios de restricción compatibles y métodos de ligadura de ADN.

El análisis del TSS y las uniones de empalme de intrón/exón del elemento reguladores se puede llevar a cabo utilizando tejido vegetal transformado. En síntesis, las plantas se

transformaron con los vectores de expresión vegetal que comprendían los fragmentos de ADN clonados ligados funcionalmente a una molécula de ADN transcribible heteróloga. A continuación, se utilizó el 5´ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (sistema para amplificación rápida de extremo de ADNc), Versión 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, California 92008) para confirmar el TSS y las uniones de empalme de intrón/exón del elemento regulador mediante el análisis de la secuencia de ADN de los transcritos de ARNm producidos.

Las secuencias de ADN que codifican para los grupos de elementos reguladores de expresión transcripcionales o secuencias EXP de *Cucumis* y *Medicago* que comprenden un elemento promotor, ligado funcionalmente a un elemento líder se presentan en la Tabla 1 junto con sus promotores y líderes correspondientes.

Tabla 1. Grupos de elementos reguladores de expresión transcripcional, promotores, líderes e intrones aislados de *Cucumis melo* y *Medicago truncatula*

Descripción	**SEQ ID N.º:**	**Notación génica:**
EXP-Mt.PSII-T:1:1	13	Precursor de cloroplasto del fotosistema II
P-Mt.PSII-T-1:2:1	14	Precursor de cloroplasto del fotosistema II
L-Mt.PSII-T-1:2:1	15	Precursor de cloroplasto del fotosistema II

Ejemplo 2

Análisis de elementos reguladores que impulsan la expresión de GUS en plantas de soja transformadas de forma estable

Se transformaron plantas de soja con vectores, específicamente vectores de expresión vegetales, que contenían un elemento regulador de prueba que impulsa la expresión del transgén de β-glucuronidasa (GUS). Las plantas resultantes se analizaron para determinar la expresión de la proteína GUS, para evaluar el efecto de los elementos reguladores seleccionados sobre la expresión.

Las plantas de soja se transformaron con las construcciones de expresión de GUS vegetales indicas en la Tabla 2. Los elementos reguladores se clonaron en un vector de expresión vegetal base utilizando métodos estándares conocidos en la técnica. Los vectores de expresión vegetales resultantes contenían un región de borde derecho de *Agrobacterium*

tumefaciens (B-AGRtu.borde derecho), un primer casete de selección de transgén utilizado para la selección de células vegetales transformadas que confieren resistencia al herbicida glifosato o al antibiótico espectinomicina; un segundo casete de transgén para evaluar la actividad del elemento regulador, que comprende una secuencia EXP ligada funcionalmente en dirección a 5´ a una secuencia codificante para ß-glucuronidasa (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO: 17) que contiene un intrón procesable derivado del gen ST-LS1 específico para tejido inducible por luz de la papa (N.º de acceso a Genbank: X04753), ligado funcionalmente en dirección a 5´ a una región de terminación en dirección de 3´ del gen E6 de *Gossypium barbadense* (T-Gb.E6-3b:3b:1, SEQ ID NO: 18); y una región de borde izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.borde izquierdo).

Tabla 2. Elementos reguladores y construcciones plasmídicas de expresión de GUS correspondientes

Construcción	**Descripción de EXP**	**SEQ ID N.º:**
pMON116792	EXP-Mt.PSII-T:1:1	13

Se transformaron células vegetales de soja utilizando construcciones de vector de transformación binario descritas anteriormente mediante transformación mediada por *Agrobacterium*, utilizando métodos conocidos en la técnica. Se indujo a las células vegetales transformadas resultantes a formar plantas de soja enteras.

Se utilizó un análisis de GUS histoquímico para el análisis de expresión cualitativo y cuantitativo de plantas transformadas. Se incubaron secciones de tejido entero con solución de tinción de GUS X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-glucurónido) (1 miligramo/mililitro) durante una extensión de tiempo adecuada, se enjugaron y se inspeccionaron visualmente para determinar la coloración azul. La actividad de GUS se determinó cualitativamente mediante inspección visual directa o inspección con microscopio utilizando órganos y tejidos vegetales seleccionados.

Para el análisis cuantitativo de la expresión de GUS, se extrajo la proteína total de tejidos seleccionados de plantas de soja transformadas. Se utilizó un microgramo de proteína total con el sustrato fluorogénico 4-metileumbeliferil-β-D-glucurónido (MUG) en un volumen total

de reacción de 50 microlitros. El producto de reacción, 4–metilumbeliferona (4-MU), es máximamente fluorescente a pH alto, donde el grupo hidroxilo se ioniza. La adición de una solución básica de carbonato de sodio simultáneamente detiene 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 Micromax Reader (lector), con ancho de abertura fijado en excitación a 2 nm y en emisión a 3nm. Los valores se proporcionan en unidades de nmol GUS/hora/mg de proteína total.

Se tomaron muestras de los siguientes tejidos para determinar la expresión de GUS en la generación R_0; hoja en demanda, hoja en fuente y raíz de la etapa Vn5; peciolo, hoja en fuente, flor y cotiledón de la etapa R1; vaina y semilla inmadura de la etapa R3; y embrión y cotiledón de la etapa de vaina amarilla. Las Tablas 3 y 4 muestran la expresión de GUS media cuantitativa para cada uno de los tejidos de muestra impulsada por los elementos reguladores presentados en la Tabla 2.

Tabla 4. Expresión de GUS media cuantitativa en plantas de soja transformadas de forma estable impulsada por los elementos reguladores derivados de *Medicago truncatula*

Etapa	**Órgano**	**EXP-Mt.PSII-T:1:1**
Vn5	Hoja en demanda	22
Vn5	Raíz	11
Vn5	Hoja en fuente	42
R1	Peciolo	83
R1	Hoja en fuente	118
R1	Flor	21
R5	Cotiledón	9
R3	Vaina	33
R3	Semilla inmadura	9
Vaina amarilla	Embrión	0

Vaina amarilla	Cotiledón	0

Como puede observarse en las Tablas 3 , cada uno de los elementos tiene un patrón de expresión único en los tejidos de muestra. El elemento regulador EXP-CUCme.Bbz:1 (SEQ ID NO: 7) exhibió la expresión más alta en la hoja en demanda y fuente de la etapa Vn5 y en la vaina de la etapa R3. La expresión de GUS impulsada por EXP-Mt.Lhcb2:1:1 (SEQ ID N.º: 10) fue la más elevada en la hoja en fuente de la etapa Vn5 y en el peciolo de R1. EXP-Mt.PSII-T:1:1 (SEQ ID N.º: 13) exhibió la expresión más alta en la hoja en fuente de la etapa R1.

Cada elemento regulador proporciona un patrón de expresión único que puede utilizarse para impulsar de forma óptima la expresión de transgenes diferentes, dependiendo de la preferencia del tejido deseado para la expresión.

Ejemplo 3

Elementos potenciadores derivados de los elementos reguladores

Los potenciadores se derivan de los elementos promotores presentados como la SEQ ID NO: 14 . El elemento potenciador puede comprender uno o más elementos reguladores en *cis* que cuando están ligados funcionalmente en dirección a 5´ o 3´ a un elemento promotor o están ligados funcionalmente en dirección a 5´ o 3´ a elementos potenciadores adicionales que están ligados funcionalmente a un promotor, pueden potenciar o modular los niveles de expresión de una molécula de ADN transcribible o proporcionar la expresión de una molécula de ADN transcribible en un tipo de célula u órgano vegetal específico o en un punto de tiempo específico en el desarrollo o ritmo circadiano. Los potenciadores se producen extrayendo la secuencia TATA o elementos funcionalmente similares y cualquier secuencia posterior de los promotores que permiten que la transcripción se inicie a partir de una secuencia promotora, por ejemplo las secuencias presentadas como SEQ ID NO: 14 o sus fragmentos.

La secuencia TATA en los promotores vegetales no está conservada como en algunos otros organismos eucariontes. Por lo tanto, a efectos de definir un fragmento como un potenciador, primero se debe identificar el sitio de inicio transcripcional (TSS) del gen, donde la UTR en dirección a 5´ se transcribe primero. Por ejemplo, el elemento regulador transcripcional, EXP-Mt.Lhcb2:1:1 (SEQ ID NO: 10) comprende el elemento promotor, P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID NO: 11), ligado funcionalmente a la UTR en dirección a 5´ o elemento líder, L-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID NO: 12). Dentro del elemento promotor de 1837 bp, P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID NO:

11), el elemento similar a TATA central putativo se encuentra dentro de los nucleótidos 1798 a 1803. Un fragmento potenciador derivado de P-Mt.Lhcb2-1:2:1 podría comprender los nucleótidos 1 a 1797 de SEQ ID NO: 11, que resultaría en la secuencia presentada como SEQ ID NO: 16 (E-Mt.Lhcb2). Los potenciadores derivados del promotor, P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID NO: 11) pueden comprender además fragmentos más pequeños de E-Mt.Lhcb2 (SEQ ID NO: 16). La efectividad de los elementos potenciadores derivados del promotor, P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID NO: 11) se determina empíricamente mediante la construcción de un elemento regulador transcripcional quimérico que comprende un potenciador derivado del promotor, P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID NO: 11), que está ligado funcionalmente a un promotor y líder y se utiliza para impulsar la expresión de una molécula de ADN transcribible tal como GUS en un ensayo en planta estable o transitorio.

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

Los elementos potenciadores derivados de los elementos promotores presentados como la SEQ ID NO: 14 se clonan utilizando métodos conocidos en la técnica para que estén ligados funcionalmente en dirección a 5´ o 3´ a un elemento promotor o que estén ligados funcionalmente en dirección a 5´ o 3´ a elementos potenciadores adicionales que están ligados funcionalmente a un promotor. Alternativamente, se pueden clonar elementos potenciadores, utilizando métodos conocidos en la técnica, para proporcionar un elemento potenciador más grande que comprende dos o más copias del potenciador y clonarlo utilizando métodos conocidos en la técnica para que esté ligado funcionalmente en dirección a 5´ o 3´ a un elemento promotor o que esté ligado funcionalmente en dirección a 5´ o 3´ a elementos potenciadores adicionales que están ligados funcionalmente a un promotor produciendo así un elemento regulador transcripcional quimérico. Los elementos potenciadores también se pueden clonar utilizando métodos conocidos en la técnica para que estén ligados funcionalmente en dirección a 5´a un elemento promotor derivado de un

organismo del género diferente, o que estén ligados en dirección a 5´ o 3´ a elementos potenciadores adicionales derivados de otros organismos del género que están ligados funcionalmente a un promotor derivado del mismo organismo del género o de uno diferente, resultando en un elemento regulador transcripcional quimérico. Se puede construir un vector de transformación vegetal de expresión de GUS utilizando métodos conocidos en la técnica similar a las construcciones descritas en el Ejemplo 2 anterior en el que los vectores de expresión vegetal contienen una región de borde derecho de *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.borde derecho), un primer casete de selección de transgén usado para la selección de células vegetales transformadas que confiere resistencia al antibiótico espectinomicina; y un segundo casete de transgén para evaluar el elemento potenciador que comprende el elemento potenciador ligado funcionalmente en dirección a 5´ o 3´ a un elemento promotor o ligado funcionalmente en dirección a 5´ o 3´ a elementos potenciadores adicionales que a su vez están ligados funcionalmente a un promotor que está ligado funcionalmente en dirección a 5´ a un elemento líder, ligado funcionalmente a una secuencia codificante para ß-glucuronidasa (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO: 17) que contiene un intrón procesable derivado del gen ST-LS1 específico para tejido inducible por luz de la papa (N.º de acceso a Genbank: X04753), ligado funcionalmente a una región de terminación en dirección de 3´ del gen E6 de *Gossypium barbadense* (T-Gb.E6-3b:3b:1, SEQ ID NO: 18), y una región de borde izquierdo de *A. tumefaciens* (B-AGRtu.borde izquierdo). Los plásmidos resultantes se utilizan para transformar plantas de soja u otras plantas del género mediante los métodos descritos anteriormente. Alternativamente, las células de protoplasto derivadas de la soja u otras plantas del género se transforman utilizando métodos conocidos en la técnica para llevar a cabo ensayos transitorios.

La expresión de GUS impulsada por un elemento regulador que comprende uno o más potenciadores se evalúa en ensayos en plantas estables o transitorios para determinar los efectos del elemento potenciador sobre la expresión de una molécula de ADN transcribible. Se pueden realizar modificaciones a uno o más elementos potenciadores o la duplicación de uno o más elementos potenciadores con base en la experimentación empírica 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 o especificidad transcripcional del elemento regulador o regulador quimérico y se determina empíricamente para identificar a los mejores potenciadores para el perfil de expresión de transgén deseado dentro de la planta de maíz u otra planta del género.

* * * * * * *

Tras ilustrar y describir los principios de la presente invención, será evidente para los expertos en la técnica que la invención puede modificarse en su disposición y detalles sin apartarse de dichos principios. Reivindicamos que todas las modificaciones están dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones. Todas las publicaciones y documentos de patente publicados mencionados en la presente se incorporan por referencia a la presente en la misma medida que si cada publicación o solicitud de patente individual se indicara específica e individualmente como incorporada por referencia.