

PATENTE
MONS:464US

SOLICITUD DE PATENTE EN ESTADOS UNIDOS
PARA
ELEMENTOS REGULADORES DE PLANTAS Y USOS DE LOS MISMOS
a nombre de
Ian W. Davis
y
Aabid Shariff

REFERENCIA A LA SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense N.º 62/714.228, presentada el 3 de agosto de 2018, que se incorpora por referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DE LISTADO DE SECUENCIAS

El listado de secuencias contenido en el archivo bajo el nombre "38-21-62691-0001_Seqlist_ST25.txt", que pesa 31.060 bytes (medido en Microsoft Windows®) y fue creado el 2 de julio de 2019, se presenta junto con la presente por vía electrónica y se incorpora en la presente por referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con el campo de la biología molecular en plantas y la manipulación genética de plantas. Más específicamente, la invención se refiere a las moléculas de ADN útiles para modular la expresión génica en plantas.

ANTECEDENTES

Los elementos reguladores son elementos genéticos que regulan la actividad génica al modular la transcripción de una molécula de ADN transcribable operativamente ligada. Dichos elementos pueden incluir promotores, líderes, intrones, y regiones no traducidas 3', y son útiles en el campo de la biología molecular en plantas y la manipulación genética de plantas.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La invención proporciona nuevos elementos reguladores del gen sintéticos para usar en las plantas. La invención también proporciona constructos de moléculas de ADN recombinante que comprenden elementos reguladores. La presente invención

también proporciona células vegetales, plantas, y semillas transgénicas que comprenden los elementos reguladores. En una forma de realización, los elementos reguladores están operativamente ligados a una molécula de ADN transcriptible. En ciertas formas de realización, la molécula de ADN transcriptible puede ser heteróloga con respecto a una secuencia reguladora. En consecuencia, una secuencia de elementos reguladores provista por la invención, en formas de realización particulares, se pueden definir como operativamente ligados a una molécula de ADN transcriptible heteróloga. La presente invención también proporciona métodos para usar los elementos reguladores y formar y usar las moléculas de ADN recombinante que comprenden los elementos reguladores, y las células vegetales, plantas, y semillas transgénicas que comprenden los elementos reguladores operativamente ligados a una molécula de ADN transcriptible.

Por ende, en un aspecto, la invención provee una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada entre el grupo que consiste en: a) una secuencia con al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOS: 1–19 y SEQ ID NO:26; b) una secuencia de ADN que comprende cualquiera de SEQ ID NOS: 1–19 y SEQ ID NO:26; y c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOS: 1–19 y SEQ ID NO:26, en donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; en donde la secuencia está operativamente ligada a una molécula de ADN transcriptible heteróloga. La expresión “molécula de ADN transcriptible heteróloga” hace referencia a que la molécula de ADN transcriptible es heteróloga con respecto a la una secuencia de polinucleótidos a la que está operativamente ligada. En formas de realización específicas, la molécula de ADN recombinante comprende una secuencia de ADN que tiene al menos al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 86%, al menos aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de

identidad de secuencia con la secuencia de ADN de cualquiera de las SEQ ID NOs:1-19 y SEQ ID NO:26. En formas de realización particulares, la secuencia de ADN comprende un elemento regulador. En algunas formas de realización, el elemento regulador comprende un promotor. En aún otras formas de realización, el elemento regulador comprende un intrón. En aún otras formas de realización, el elemento regulador comprende una 3' UTR. En aún otras formas de realización, la molécula de ADN transcriptible 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 plagas de plantas en plantas. En aún otras formas de realización, la molécula de ADN transcriptible heteróloga comprende una secuencia que codifica un ARN pequeño, tal como un ARNs, un ARNm o ARNs. En aún otras formas de realización. En incluso otras formas de realización, la invención provee una construcción que comprende una molécula de ADN recombinante tal como se revela en la presente.

En otro aspecto, en la presente se proveen células vegetales transgénicas que comprenden una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada entre el grupo que consiste en: a) una secuencia con al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs:1-19 y SEQ ID NO:26; b) una secuencia que comprenden cualquiera de SEQ ID NOs:1-19 y SEQ ID NO:26; y c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOs:1-19 y SEQ ID NO:26, en donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; en donde la secuencia ADN está operativamente ligada a una molécula de ADN transcriptible heteróloga. En ciertas formas de realización, la célula vegetal transgénica es una célula de planta monocotiledónea. En otras formas de realización, la célula vegetal transgénica es una célula de planta dicotiledónea.

En incluso otro aspecto más, también se provee en la presente una planta transgénica, o parte de ella, que comprende una molécula de ADN recombinante que

comprende una secuencia de ADN seleccionada entre el grupo que consiste en: a) una secuencia con al menos 85% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs:1-19 y SEQ ID NO:26; b) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NOs:1-19 y SEQ ID NO:26; y c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOs:1-19 y SEQ ID NO:26, en donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; en donde la secuencia de ADN está operativamente ligada a una molécula de ADN transcripible heteróloga. En formas de realización específicas, la planta transgénica es una planta de prole de cualquier generación que comprende la molécula de ADN recombinante. Una semilla transgénica que comprende la molécula de ADN recombinante que produce dicha planta transgénica cuando crece también es provista en la presente.

En otro aspecto, la invención provee un método de producir un producto básico 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 básico a partir de la misma. En una forma de realización, el producto básico es semillas, semillas procesadas, concentrado de proteínas, aislado de proteínas, almidón, granos, partes de plantas, aceite de semillas, biomasa, harina y sémola.

En aún otro aspecto, la invención proporciona un método de 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 de la célula vegetal transformada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

La SEQ ID NO:1 es una secuencia de ADN de un grupo de elemento de expresión reguladora sintética (EXP), EXP-Zm.GSP850 que comprende un promotor sintético (P-Zm.GSP850.nno:4), operativamente ligado 5' a un líder sintético (L-Zm.GSP850.nno:3).

PATENTE

MONS:464US

La SEQ ID NO:2 es una secuencia de ADN de a promotor sintético, P-Zm.GSP850.nno:4.

La SEQ ID NO:3 es una secuencia de ADN de a líder sintético, L-Zm.GSP850.nno:3.

La SEQ ID NO:4 es una secuencia de ADN de un EXP, EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI153.nno:2 sintético que comprende un promotor sintético (P-Zm.GSP850.nno:4), operativamente ligado 5' a un líder sintético (L-Zm.GSP850.nno:3), operativamente ligado 5' a un intrón sintético (I-Zm.GSI153.nno:1).

La SEQ ID NO:5 es una secuencia de ADN de un intrón sintético, I-Zm.GSI153.nno:1.

La SEQ ID NO:6 es una secuencia de ADN de un EXP sintético, EXP-Zm.GSP990 que comprende un promotor sintético (P-Zm.GSP990.nno:2), operativamente ligado 5' a un líder sintético (L-Zm.GSP990.nno:1).

La SEQ ID NO:7 es una secuencia de ADN de un promotor sintético, P-Zm.GSP990.nno:2.

La SEQ ID NO:8 es una secuencia de ADN de un líder sintético, L-Zm.GSP990.nno:1.

La SEQ ID NO:9 es una secuencia de ADN de un EXP sintético, EXP-Zm.GSP990.nno+Zm.GSI197.nno:2 que comprende un promotor sintético (P-Zm.GSP990.nno:2), operativamente ligado 5' a un líder sintético (L-Zm.GSP990.nno:1), operativamente ligado 5' a un intrón sintético (I-Zm.GSI197.nno:1).

La SEQ ID NO:10 es una secuencia de ADN de un intrón sintético, I-Zm.GSI197.nno:1.

La SEQ ID NO:11 es una secuencia de ADN de un EXP sintético, EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI140.nno:1 que comprende un promotor sintético (P-Zm.GSP850.nno:4), operativamente ligado 5' a un líder sintético (L-Zm.GSP850.nno:3), operativamente ligado 5' a un intrón sintético (I-Zm.GSI140.nno:1).

La SEQ ID NO:12 es una secuencia de ADN de un intrón sintético, I-Zm.GSI140.nno:1.

La SEQ ID NO:13 es una secuencia de ADN de una 3' UTR sintética, T-Zm.GST9.nno:2.

La SEQ ID NO:14 es una secuencia de ADN de una 3' UTR sintética, T-Zm.GST18.nno:2.

La SEQ ID NO:15 es una secuencia de ADN de un EXP sintético, EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.DnaK:1 que comprende un promotor sintético (P-Zm.GSP850.nno:4), operativamente ligado 5' a un líder sintético (L-Zm.GSP850.nno:3), operativamente ligado 5' a un intrón (I-Zm.DnaK:1).

La SEQ ID NO:16 es la secuencia de ADN de un EXP sintético, EXP-Zm.GSP990.nno+Zm.DnaK:1 que comprende un promotor sintético (P-Zm.GSP990.nno:2), operativamente ligado 5' a un líder sintético (L-Zm.GSP990.nno:1), operativamente ligado 5' a un intrón (I-Zm.DnaK:1).

La SEQ ID NO:17 es una secuencia de ADN de un potenciador sintético, E-Zm.GSP850 que se deriva del promotor sintético, P-Zm.GSP850.nno:4.

La SEQ ID NO:18 es una secuencia de ADN de un potenciador sintético, E-Zm.GSP990 que se deriva del promotor sintético, P-Zm.GSP990.nno:2.

La SEQ ID NO:19 es una secuencia de ADN de a 3' UTR, T-Sb.Nltp4-1:1:2 derivada del gen de NLTP4 (proteína de transferencia de lípidos no específica 4) de *Sorghum bicolor*.

La SEQ ID NO:20 es una secuencia codificadora sintética optimizada para la expresión en plantas para β -glucuronidasa (GUS) con un intrón procesable derivado del gen ST-LS1 específico de tejido inducible por luz de papa (Acceso Genbank: X04753).

La SEQ ID NO:21 es una secuencia de ADN del EXP, EXP-CaMV.35S que comprende el promotor y líder 35S derivado del virus de mosaico de coliflor.

La SEQ ID NO:22 es una secuencia de ADN del intrón, I-Zm.DnaK:1 derivada del gen de la proteína de shock térmico 70 (Hsp70) (DnaK) de *Zea mays*.

La SEQ ID NO:23 es una secuencia de ADN de la 3' UTR, T-Os.LTP:1 derivada del gen de tipo de proteína de transferencia de lípidos (LTP) de *Oryza sativa*.

La SEQ ID NO:24 es una secuencia codificadora para β -glucuronidasa (GUS) con un intrón procesable derivada del gen ST-LS1 específico de tejido inducible por luz de papa (Acceso Genbank: X04753).

La SEQ ID NO:25 es una secuencia codificadora para la proteína fluorescente luciferasa NanoLuc[®] (Promega, Madison, WI 53711), Nluc que se manipuló

genéticamente por la evolución dirigida de una luciferasa de camarones de aguas profundas (*Oplophorus gacilirostris*).

La SEQ ID NO:26 es una secuencia de ADN de una 3' UTR sintética, T-Zm.GST43.nno:1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona elementos reguladores sintéticos que tienen actividad reguladora del gen en plantas. Las secuencias de nucleótidos de estos elementos reguladores sintéticos se proporcionan como SEQ ID NOs:1-18 y SEQ ID NO:26. Estos elementos reguladores sintéticos son capaces, por ejemplo, de afectar la expresión de una molécula de ADN transcriptible operativamente ligada en tejidos vegetales, y por lo tanto regular la expresión génica de un transgén operativamente ligado en plantas transgénicas. La invención también proporciona nuevos elementos reguladores endógenos que tienen actividad reguladora del gen en plantas y provistas como la SEQ ID NO:19. La invención también provee métodos para modificar, producir y usar las moléculas de ADN recombinante que contienen los elementos reguladores sintéticos y endógenos. La invención también provee composiciones que incluyen células vegetales, plantas, partes de las plantas y semillas transgénicas que contienen las moléculas de ADN recombinante de la invención, y métodos para preparar y usar las mismas.

Las siguientes definiciones y métodos se proveen para definir mejor la presente invención y como guía para las personas medianamente versadas en el arte en la práctica de la presente invención. A menos que se advierta lo contrario, los términos han de entenderse de acuerdo con el uso convencional dado por las personas medianamente versadas en el arte relevante.

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 base desoxirribonucleótido o una molécula de ADN leída del 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 usada en la presente corresponda a la del Título 37 del Código de Reglamentaciones Federales de los Estados Unidos § 1.822, y establecida en las tablas de la Norma de la OMPI ST.25 (1998), Apéndice 2, Tablas 1 y 3.

Tal 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 existirían naturalmente juntas sin intervención humana. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante puede ser una molécula de ADN conformada 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 comprende una secuencia de ADN sintético o una molécula de ADN que ha sido incorporada en el ADN de una célula huésped por medio de transformación genética.

Como se usa en la presente, una "secuencia de nucleótidos sintética" o "secuencia de nucleótidos artificial" es una secuencia de nucleótidos que no se sabe que se produce en la naturaleza o que no se produce naturalmente. Los elementos reguladores de genes de la presente invención comprenden secuencias de nucleótidos sintéticas. Con preferencia, las secuencias de nucleótidos sintéticos comparten poca o ninguna homología extendida con secuencias naturales. La homología extendida en este contexto generalmente se refiere al 100% de identidad de secuencia que se extiende más allá de aproximadamente 25 nucleótidos de secuencia contigua.

La referencia en esta solicitud a una "molécula de ADN aislada", o un término o frase equivalente, significa 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 nucleico tales como una secuencia codificadora,

secuencia intrónica, secuencia líder no traducida, secuencia promotora, secuencia de terminación transcripcional y similares, que se encuentran naturalmente dentro del ADN del genoma de un organismo no se consideran "aislados" siempre que 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 las subpartes de estos elementos, pueden estar "aislados" dentro del alcance de esta divulgación siempre que el elemento no se encuentre dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en el que se encuentra naturalmente. De manera similar, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida o cualquier variante insecticida natural de esa proteína sería una secuencia de nucleótidos aislada siempre que la secuencia de nucleótidos no estuviera dentro del ADN de la bacteria a partir de la cual se encuentra naturalmente la secuencia que codifica la proteína. Una secuencia de nucleótidos sintética que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína insecticida natural se puede considerar aislada para los fines de esta descripción. Para los fines de esta divulgación, cualquier secuencia de nucleótidos transgénicos, 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 puede considerar una secuencia de nucleótidos aislada si está presente dentro del plásmido o estructura 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 derivados de plantas o bacterias.

Tal como se usa en la presente, el término "identidad de secuencia" se refiere al punto al cual dos secuencias polinucleotídicas óptimamente alineadas o dos secuencias polipeptídicas óptimamente son idénticas. Una alineación de secuencia óptima se crea alineando manualmente dos secuencias por ej., una secuencia de referencia y otra secuencia, para maximizar el número de coincidencias de nucleótidos en la alineación de secuencia con inserciones, deleciones o vacíos de nucleótidos

internos apropiados. Tal como se usa en la presente, el término “secuencia de referencia” se refiere a una secuencia de ADN provista como SEQ ID NOs: 1–19 y SEQ ID NO:26.

Tal como se usa en la presente, el término “% de identidad de secuencia” o “% de identidad” o “porcentaje de identidad” es la fracción de identidad multiplicada por 100. La “fracción de identidad” para una secuencia de ADN óptimamente alineada con una secuencia de referencia es el número de coincidencias de nucleótidos en la alineación óptima, dividido por el número total de nucleótidos en la secuencia de referencia, por ej., el número total de nucleótidos en la longitud completa de la secuencia de referencia entera. Por ende, una forma de realización de la invención provee una molécula de ADN que comprende una secuencia que, cuando está alineada óptimamente con una secuencia de referencia, provista en la presente como SEQ ID NOs: 1–19 y SEQ ID NO:26, tiene al menos aproximadamente 85% de identidad, al menos aproximadamente 86% de identidad, al menos aproximadamente 87% de identidad, al menos aproximadamente 88% de identidad, al menos aproximadamente 89% de identidad, al menos aproximadamente 90% de identidad, al menos aproximadamente 91% de identidad, al menos aproximadamente 92% de identidad, al menos aproximadamente 93% de identidad, al menos aproximadamente 94% de identidad, al menos aproximadamente 95% de identidad, al menos aproximadamente 96% de identidad, al menos aproximadamente 97% de identidad, al menos aproximadamente 98% de identidad, al menos aproximadamente 99% de identidad, o al menos aproximadamente 100% de identidad con la secuencia de referencia. Las moléculas de ADN que tienen un por ciento de identidad de secuencia con la molécula de referencia pueden exhibir la actividad de la secuencia de referencia.

Elementos reguladores

Los elementos reguladores tal como promotores, líderes (también conocidos como 5' UTR), potenciadores, intrones, y regiones de terminación de transcripción (o 3'

UTRs) juegan una parte integral en la expresión total de los genes en las células vivientes. 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 usa en la presente, se refiere a la habilidad para afectar la expresión de una molécula de ADN transcriptible operativamente ligada, por ejemplo, al afectar la transcripción y/o traducción de la molécula de ADN transcriptible operativamente ligada. Los elementos reguladores, tales como promotores, líderes, potenciadores, introne y 3' UTRs, que funcionan en las plantas son útiles para modificar los fenotipos de las plantas a través de manipulación genética.

Tal como se usa en la presente, una secuencia de "grupo de elementos de expresión reguladores" o “EXP” puede referirse a un grupo de elementos reguladores operativamente ligados, tales como potenciadores, promotores, líderes e intrones. Por ejemplo, un grupo de elementos de expresión reguladores puede estar conformado, por ejemplo, por un promotor operativamente ligado 5' a una secuencia líder. Los útiles de EXP para practicar la presente invención incluyen los SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9, 11, 15 y 16.

Los elementos reguladores pueden estar caracterizados por su patrón de expresión génica, por ej., efectos positivos y/o negativos tal como expresión constitutiva o expresión que responde a factores temporales, espaciales, de desarrollo, de tejido, ambientales, fisiológicos, del ciclo celular y/o químicos, y cualquier combinación de ellos, así como también por 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 operativamente ligada en una molécula de ARN transcripta. La molécula de ARN transcripta puede ser traducida para producir una molécula de proteína o puede proveer una molécula antisentido u otra molécula de ARN reguladora, tal como ARN bicatenario (dsRNA, *double-stranded RNA*), ARN de transferencia

(ARNt), ARN ribosomal (ARNr), un microARN (miARN), un ARN de transferencia pequeño (ARNsi) y similares.

Tal como se usa en la presente, el término “expresión de proteínas” es cualquier patrón de traducción de una molécula de ARN transcrita en una molécula de proteína. La expresión de proteínas puede estar caracterizada por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo o morfológicas, así como también por indicaciones cuantitativas o cualitativas.

Un promotor es útil como elemento regulador para modular la expresión de una molécula de ADN transcriptible operativamente ligada. Tal como se usa en la presente, el término “promotor” se refiere, por lo general, a una molécula de ADN que participa en el reconocimiento y la unión de ARN polimerasa II y otras proteínas, tales como factores de transcripción de acción en trans, para iniciar la transcripción. Un promotor se puede aislar inicialmente de la región no traducida 5' (5' UTR) de una copia genómica de un gen. En forma alternativa, los promotores pueden ser moléculas de ADN producidas o manipuladas sintéticamente. 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 para llevar a la práctica la invención incluyen elementos promotores proporcionados como SEQ ID NO: 2 y 7, o comprendidos dentro de cualquiera de SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9, 11, 15 y 16 o los fragmentos o variantes de ellos. En formas de realización específicas de la invención, las moléculas de ADN reivindicadas y cualesquiera variantes o derivados de ellas tal como se describen en la presente, se definen adicionalmente como moléculas que comprenden actividad promotora, es decir, que son capaces de actuar como un promotor en una célula huésped, tal como en una planta transgénica. En incluso otras formas de realización específicas, es posible definir un fragmento por exhibir actividad promotora poseída por la molécula promotora de inicio de la cual deriva, o un fragmento puede comprender un “promotor mínimo” que provee un nivel basal de

transcripción y está conformado por una caja TATA o secuencia de ADN equivalente para el reconocimiento y la unión del complejo ARN polimerasa II para el inicio de la transcripción.

En una forma de realización, se proveen fragmentos de una secuencia de EXP o una secuencia promotora que se revela en la presente. Los fragmentos de promotores pueden comprender actividad promotora, tal como se describió con anterioridad, y se pueden usar solos o en combinación con otros promotores y fragmentos de promotores, tal como al construir promotores quiméricos en combinación con otros elementos de expresión y fragmentos de elementos de expresión. En formas de realización específicas, se proveen fragmentos de un promotor que comprenden al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 95, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 125, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 175, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 225, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 275, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 750, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, o al menos aproximadamente 1000 nucleótidos contiguos, o más, de una molécula de ADN que tiene actividad promotora tal como se revela en la presente. Los métodos para producir dichos fragmentos a partir de una molécula promotora de inicio son ampliamente conocidos en el arte.

En formas de realización adicionales, los fragmentos de secuencias de potenciador o intrón descriptas en la presente. Los fragmentos de potenciador o intrón pueden comprender la actividad de la molécula base de las cual se derivaron y puede ser útiles solas o en combinación con otros elementos reguladores que incluyen promotores, líderes, otros potenciadores, otros intrones, o fragmentos de los mismos. En formas de realización específicas, se proporcionan fragmentos de un potenciador o

intrón que comprenden al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 95, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 125, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 175, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 225, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 275, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 750, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, o al menos aproximadamente 1000 nucleótidos contiguos, o más largos, de una molécula de ADN que tiene actividad potenciadora o intrónica como se describe en la presente. Los métodos para producir tales fragmentos a partir de una molécula de partida son bien conocidos en el arte.

En otras formas de realización, se proporcionan los fragmentos de secuencias de 3' UTR descritas en la presente. Los fragmentos de 3' UTR pueden comprender la actividad de la molécula 3' UTR base del cual se derivaron, y pueden ser útiles solos o en combinación con otros elementos reguladores que incluyen promotores, líderes, intrones, o fragmentos de los mismos. En formas de realización específicas, se proporcionan fragmentos de un intrón que comprende al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 95, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 125, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 175, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 225, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 275, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 750, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, o al menos aproximadamente 1000 nucleótidos contiguos, o más largas de una molécula de ADN que tiene actividad 3' UTR descrita en la presente. Los métodos para producir tales fragmentos a partir de una molécula de 3' UTR partida son bien conocidos en el arte.

Las composiciones derivadas de cualquiera de los elementos promotores proporcionados presentados como SEQ ID NOs:2 y 7, o comprendidos dentro de cualquiera de las SEQ ID NOs:1, 4, 6, 9, 11, 15, y 16, tal como delecciones internas o 5', por ejemplo, pueden producirse usando métodos ampliamente conocidos en el arte para mejorar o alterar la expresión, incluido retirar elementos que tienen efectos positivos o negativos sobre la expresión; duplicar elementos que tienen efectos positivos o negativos sobre la expresión; y/o duplicar o retirar elementos que tienen efectos específicos de tejidos o células sobre la expresión. Las composiciones derivadas de cualquiera de los promotores presentados como SEQ ID NOs:2 y 7, o comprendidos dentro de cualquiera de las SEQ ID NOs:1, 4, 6, 9, 11, 15, y 16, conformados por delecciones 3' en los cuales el elemento de caja TATA o secuencia de ADN equivalente de la misma y la secuencia corriente abajo se retiran, se pueden usar, por ejemplo, para formar elementos potenciadores. Es posible realizar otras delecciones para retirar cualesquiera elementos que tengan efectos positivos o negativos, específicos de tejidos, específicos de células, o específicos de tiempo (tales como, pero sin limitarse a ritmos circadianos) sobre la expresión. Cualquiera de los promotores presentados como SEQ ID NOs:2 y 7, o comprendidos dentro de cualquiera de las SEQ ID NOs:1, 4, 6, 9, 11, 15, y 16 y fragmentos o potenciadores derivados de los mismos se pueden usar para formar composiciones de elementos reguladores transcripcionales quiméricos.

De acuerdo con la invención, un promotor o fragmento de promotor puede ser analizado en cuanto a la presencia de elementos promotores conocidos, es decir, características de la secuencia de ADN, tal como una caja TATA y otros motivos de sitios de unión de factor de transcripción conocidos. La identificación de dichos elementos promotores conocidos puede ser usada por las personas versadas en el arte para diseñar variantes del promotor que tengan un patrón de expresión similar al del promotor original.

Tal como se usa en la presente, el término “líder” se refiere a una molécula de ADN aislada de la región no traducida 5' (5' UTR) de un gen y definida en términos generales como un segmento de nucleótido entre el sitio de inicio de transcripción (TSS, del inglés *Transcription Start Site*) y el sitio de inicio de secuencia codificadora de proteína. En forma alternativa, los líderes pueden ser elementos de ADN producidos o manipulados sintéticamente. Es posible usar un líder como un elemento regulador 5' para modular la expresión de una molécula de ADN transcribable operativamente ligada. Las moléculas líderes se pueden usar con un promotor heterólogo o con su promotor nativo. Los líderes útiles para llevar a la práctica la presente invención incluyen SEQ ID NOs:3 y 8; o cualquiera de los elementos líder comprendidos dentro de cualquiera de las SEQ ID NOs:1, 4, 6, 9, 11, 15, y 16 o fragmentos o variantes de ellas. En formas de realización específicas, dichas secuencias de ADN se pueden definir como secuencias capaces de actuar como un líder en una célula huésped, incluida, por ejemplo, una célula vegetal transgénica. En una forma de realización, dichas secuencias se decodificadas por secuencias que comprenden actividad como líder.

Las secuencias líderes (también conocidas como 5' UTR) presentadas como SEQ ID NO: 3 y 8 o cualquiera de los elementos líderes comprendidos dentro de cualquiera de SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9, 11, 15 y 16 pueden estar conformadas por elementos reguladores o pueden adoptar estructuras secundarias que pueden tener un efecto sobre la transcripción o traducción de una molécula de ADN transcribable operativamente ligada. Las secuencias líderes presentadas como SEQ ID NOs: 3 y 8; o cualquiera de los elementos líder comprendidos dentro de cualquiera de las SEQ ID NOs:1, 4, 6, 9, 11, 15, y 16 se pueden usar de acuerdo con la invención para formar elementos reguladores quiméricos que afectan la transcripción o traducción de una molécula de ADN transcribable operativamente ligada.

Tal como se usa en la presente, el término “intrón” se refiere a una molécula de ADN que puede ser aislada o identificada a partir de un gen y puede ser definida en términos generales como una región de unión durante el procesamiento del ARN mensajero (ARNm) antes de la traducción. En forma alternativa, un intrón puede ser un elemento de ADN producido o manipulado sintéticamente. Un intrón puede contener elementos potenciadores que efectúan la transcripción de genes operativamente ligados. Un intrón se puede usar como un elemento regulador para modular la expresión de una molécula de ADN transcriptible operativamente ligada. Una construcción puede comprender un intrón, y el intrón puede o no ser heterólogo con respecto a la molécula de ADN transcriptible. Los ejemplos de intrones en el arte incluyen el intrón de la actina del arroz y el intrón HSP70 del maíz.

En las plantas, la inclusión de algunos intrones en las construcciones del gen genera la acumulación incrementada de ARNm y proteína con relación a las construcciones que carecen del intrón. Este efecto ha sido denominado “potenciamiento mediado por intrones” (IME, del inglés *Intron Mediated Enhancement*) de expresión génica. Los intrones conocidos por estimular la expresión en las plantas han sido identificados en genes de maíz (por ej., *tubA1*, *Adh1*, *Sh1*, y *Ubi1*), en genes de arroz (por ej., *tpi*) y en genes de planta dicotiledóneas tal como los de la petunia (por ej., *rbcS*), papa (por ej., *st-ls1*) y de *Arabidopsis thaliana* (por ej., *ubq3* y *pat1*). Se ha demostrado que las deleciones o mutaciones dentro de los sitios de empalme de un intrón reducen la expresión génica, lo que indica que el empalme podría ser necesario para el IME. No obstante, el IME en las plantas dicotiledóneas ha sido demostrado por mutaciones puntuales dentro de los sitios de empalme del gen *pat1* de *A. thaliana*. Se ha demostrado que los múltiples usos del mismo intrón en una planta presentan desventajas. En esos casos, es necesario tener cuenta de los elementos de control básicos para la construcción de los elementos de ADN recombinante apropiados. Los

ejemplos de intrones útiles en la práctica de la presente invención se presentan como las SEQ ID NOs:5, 10, y 12.

Tal como se usa en la presente, los términos “molécula de terminación de transcripción 3’”, “región no traducida 3’” o “3’ UTR” se refieren a una molécula de ADN que se usa durante la transcripción a la región no traducida de la porción 3’ de una molécula de ARN. La región no traducida 3’ de una molécula de ARNm se puede generar mediante escisión específica y poliadenilación 3’, también conocido como “cola polea”. Una 3’ UTR puede estar operativamente ligada a una molécula de ADN transcripible y ubicada corriente debajo de la misma, y puede incluir una señal de poliadenilación y otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción, el procesamiento de ARNm o la expresión génica. Se cree que las colas polyA funcionan en la estabilidad del ARNm y en el inicio de la traducción. Los ejemplos de moléculas de terminación de transcripción 3’ en el arte son la región 3’ de nopalina sintasa; la región 3’ de hsp17 del trigo, región 3’ de subunidad pequeña de guisante rubisco, la región 3’ de E6 3’ de algodón, y la 3’ UTR de coixin.

Las 3’ UTRs típicamente encuentran un uso beneficioso para la expresión recombinante de moléculas de ADN específicas. una 3’ UTR débil tiene el potencial de generar translectura (*read-through*), lo que puede afectar la expresión de la molécula de ADN ubicada en los casetes de expresión vecinos. El control apropiado de la terminación de la transcripción puede evitar translectura en las secuencias de ADN (por ej., otros casetes de expresión) localizadas corriente abajo y también puede permitir el reciclado eficiente de ARN polimerasa para mejorar la expresión génica. La terminación eficiente de transcripción (liberación de ARN polimerasa II del ADN) es prerequisite para el re-inicio de la transcripción y, de esta manera, afecta directamente el nivel del transcripto en general. Después de la terminación de la transcripción, el ARNm maduro es liberado del sitio de síntesis y el molde es transportado al citoplasma. Los ARNm eucarióticos se acumulan como formas poly(A) *in vivo*, lo que hace difícil detectar los

sitios de terminación de transcripción mediante métodos convencionales. No obstante, la predicción de 3' UTRs funcionales y eficientes mediante métodos bioinformáticas es difícil por el hecho de que no existen secuencias de ADN conservadas que permitirían la fácil predicción de una 3' UTR efectiva.

Desde el punto de vista de la práctica, por lo general es beneficioso que una 3' UTR usada en un casete de expresión posea las siguientes características. En primer lugar, la 3' UTR debería poder terminar la transcripción del transgén de manera eficiente y efectiva, y evitar la translectura del transcripto en cualquier secuencia de ADN vecina que puede estar conformada por otro casete de expresión como en el caso de múltiples casetes de expresión que residen en un ADN de transferencia (T-ADN), o el ADN cromosómico vecino en el cual se ha insertado el T-ADN. En segundo lugar, la 3' UTR no debería causar una reducción en la actividad de transcripción impartida por el promotor, líder, potenciadores e intrones que se usan para dirigir la expresión de la molécula de ADN. Finalmente, en la biotecnología en plantas, la 3' UTR se usa con frecuencia para cebar las reacciones de amplificación del ARN transcripto reverso extraído de la planta transformada y usado para: (1) evaluar la actividad de transcripción o la expresión del casete de expresión una vez integrado en el cromosoma de la planta; (2) evaluar el número de copia de las inserciones dentro del ADN de la planta; y (3) evaluar la cigosidad de la semilla resultante después de la reproducción. La 3' UTR también se usa en las reacciones de amplificación del ADN extraído de la planta transformada para caracterizar la cualidad de intacto del casete insertado. Las 3' UTR útiles en la práctica de la presente invención se presentan como las SEQ ID NOS:13, 14, 19, y 26.

Tal como se usa en la presente, el término “potenciador” o “elemento potenciador” se refiere a un elemento regulador de acción en cis, es decir, un elemento cis, que confiere un aspecto del patrón de expresión total, pero que usualmente es insuficiente en forma individual para dirigir la transcripción, de una molécula de ADN

transcriptible operativamente ligada. A diferencia de los promotores, los elementos potenciadores usualmente no incluyen un sitio de inicio de transcripción (TSS) o caja 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 operativamente ligada. Un elemento potenciador también se puede fusionar a un promotor para producir un elemento promotor quimérico cis, que confiere un aspecto de la modulación total de expresión génica.

Se cree que muchos elementos promotores y potenciadores unen proteínas de unión a ADN y/o afectan la topología del ADN, lo que produce conformaciones locales que selectivamente permiten o restringen el acceso de la ARN polimerasa al molde de ADN o que facilitan la apertura selectiva de la hélice doble en el sitio del inicio de transcripción. Un elemento potenciador puede funcionar para unir factores de transcripción que regulan la transcripción. Algunos elementos potenciadores unen 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 pueden estar identificados por un número de técnicas, con inclusión de análisis de delección, es decir, deleccionar uno o más nucleótidos del término 5' o interno a un promotor; análisis de proteína de unión a ADN usando protección frente a la digestión con ADNasa I (*footprinting*), interferencia de metilación, ensayos de cambios en la corrida electroforética, huella genómica *in vivo* por reacción en cadena de la polimerasa mediada por ligación (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), y otros ensayos convencionales; o mediante análisis de similitud de secuencias de ADN usando motivos de elementos cis conocidos o elementos potenciadores como secuencia blanco o motivo blanco con métodos de comparación de secuencias de ADN convencionales, tales como BLAST. La estructura fina de un dominio potenciador puede estudiarse en mayor medida mediante mutagénesis (o sustitución) de uno o más

nucleótidos o mediante otros métodos convencionales conocidos en el arte. Los elementos potenciadores pueden ser obtenidos mediante síntesis química o mediante aislamiento a partir de los elementos reguladores que incluyen dichos elementos, y pueden ser sintetizados con nucleótidos flanqueadores adicionales que contienen sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar la posterior manipulación. Por ende, el diseño, la construcción y el uso de los elementos potenciadores de acuerdo con los métodos que se revelan en la presente para modular la expresión de las moléculas de ADN transcribibles operativamente ligadas son abarcados por la invención. Los ejemplos de potenciadores útiles en la práctica de esta invención se presentan como SEQ ID NO: 17 y 18.

Tal como se usa en la presente, el término “quimérico” se refiere a una única molécula de ADN producida al fusionar una primera molécula de ADN a una segunda molécula de ADN, donde ni la primera ni la segunda molécula de ADN normalmente estaría contenida en esa configuración; es decir, fusionada a la otra. La molécula de ADN quimérica es, por ende, una molécula de ADN nueva que normalmente no estaría encontrada en la naturaleza. Tal como se usa en la presente, el término “promotor quimérico” se refiere a un promotor producido a través de dicha manipulación de 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. Por ende, el diseño, la construcción y el uso de promotores quiméricos de acuerdo con los métodos que se revelan en la presente para modular la expresión de moléculas de ADN transcribibles operativamente ligadas son abarcados por la presente invención.

Los elementos reguladores quiméricos pueden diseñarse de tal manera que comprendan varios elementos constitutivos que pueden estar ligados operativamente mediante varios métodos conocidos en el arte, tales como digestión de enzimas de restricción y ligación, clonación independiente de ligación, ensamblaje modular de productos de PCR durante la amplificación, o síntesis química directa del elemento

regulador, así como también otros métodos conocidos en el arte. Los varios elementos reguladores quiméricos resultantes pueden estar conformados por los mismos elementos constitutivos, o variantes de los mismos, pero difieren en la secuencia de ADN o secuencias de ADN que comprenden la secuencia de ADN de unión o las secuencias que permiten que las partes constitutivas se ligen operativamente. En la invención, las secuencias de ADN provistas como SEQ ID NOs: 1–19 y SEQ ID NO:26 puede ofrecer una secuencia de referencia del elemento regulador, en donde los elementos constitutivos que comprenden la secuencia de referencia pueden ser unidos mediante los métodos conocidos en el arte y pueden comprender sustituciones, deleciones y/o inserciones de uno o más nucleótidos o mutaciones que naturalmente ocurren en la transformación de células bacterianas y vegetales.

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 similar en composición, mas no idéntico, a una primera molécula de ADN, y en donde la segunda molécula de ADN todavía mantiene la funcionalidad general, es decir, un patrón de expresión igual o similar, por ejemplo a través de actividad de transcripción o traducción más o menos equivalente, de la primera molécula de ADN. Una variante puede ser una versión acortada o truncada de la primera molécula de ADN y/o una versión alterada de la secuencia de ADN de la primera molécula de ADN, tal como una con diferentes sitios de enzimas de restricción y/o deleciones, sustituciones y/o inserciones internas. Una "variante" también puede abarcar un elemento regulador que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, deleción o inserción de uno o más nucleótidos de una secuencia de referencia, en donde el elemento regulador derivado tiene una actividad transcripcional o traduccional mayor o menor o equivalente que el correspondiente molécula reguladora parental. Las “variantes” de elementos reguladores también abarcarán variantes surgidas a partir de mutaciones que ocurren durante o como resultado de la transformación de células vegetales o bacterianas. En

la invención, una secuencia de polinucleótidos provista como SEQ ID NOs:1-19 y SEQ ID NO:26 se puede usar para crear variantes que son similares en composición, mas no idénticas, a la secuencia de ADN del elemento regulador original, al tiempo que todavía mantiene la funcionalidad general, es decir, patrón de expresión igual o similar, del elemento regulador original. La producción de dichas variantes de la invención es bien sabida por la persona medianamente versada en el arte a la luz de la divulgación y se encuentra dentro del alcance de la invención.

La eficacia de las modificaciones, duplicaciones o deleciones descritas en la presente sobre los aspectos deseados de la expresión de un transgén particular se pueden evaluar de manera empírica en ensayos estables y transitorios en plantas, tal como los que se describen en los ejemplos de trabajo de la presente, a fin de validar los resultados, que pueden variar de acuerdo con los cambios efectuados y el propósito del cambio en la molécula de ADN de inicio.

Construcciones

Tal como se usa en la presente, el término “construcción” hace referencia a cualquier molécula de ADN recombinante tal como de plásmido, cósmido, virus, fago, o ADN lineal o circular, o molécula de ARN, derivada de cualquier fuente, capaz de la integración genómica o la replicación autónoma, que comprende una molécula de ADN donde al menos una molécula de ADN ha sido ligada a otra molécula de ADN de manera funcionalmente operativa; es decir, ligada operativamente. Tal como se usa en la presente, el término “vector” hace referencia a cualquier construcción que se puede usar a los efectos de la transformación; es decir, la introducción de ADN o ARN heterólogo en una célula huésped. 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 operativamente ligada a uno o más elementos reguladores, típicamente al menos un promotor y una 3' UTR.

Tal como se usa en la presente, el término “operativamente ligada” se refiere a una primera molécula de ADN unida a una segunda molécula de ADN, en donde la primera y la segunda moléculas de ADN se disponen de tal manera 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 estar adyacentes. Por ejemplo, un promotor está operativamente ligado a una molécula de ADN transcripible si el promotor modula la transcripción de la molécula de ADN transcripible de interés en una célula. Un líder, por ejemplo, está operativamente ligado 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 proveer, en una forma de realización, como construcciones límite de plásmido inductor de tumor doble (Ti, del inglés *Double Tumor-Inducing*) que tiene las regiones de límite derecho (RB, del inglés *Right Border*, o AGRtu.RB) y el límite izquierdo (LB, del inglés *Left Border*, o AGRtu.LB) del plásmido Ti aisladas de *Agrobacterium tumefaciens* que comprende un ADN-T que, junto con las moléculas de transferencia provistas por las células de *A. tumefaciens*, permiten la integración del ADN-T en el genoma de una célula vegetal (véase, por ej., la patente U.S. 6.603.061). Las construcciones también pueden contener los segmentos de ADN de la estructura de plásmido que brindan función de replicación y selección antibiótica en células bacterianas; por ej., un origen de replicación de *Escherichia coli* tal como ori322, un origen de replicación de rango de huésped amplio tal como oriV o oriRi, y una región codificadora para un marcador seleccionable tal como Spec/Strp que codifica Tn7 aminoglucósido adeniltransferasa (*aadA*) que confiere resistencia a espectinomicina o estreptomicina, o un gen de marcador seleccionable de gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación en plantas, la cepa bacteriana huésped con frecuencia es *A. tumefaciens* ABI, C58, o LBA4404; no obstante, es

posible que otras cepas conocidas por las personas versadas en el arte funcionen en la invención.

En el arte se conocen métodos para ensamblar e introducir construcciones en una célula de tal manera que la molécula de ADN transcripible se transcriba en una molécula de ARNm funcional que se traduce y expresa como proteína. Para la práctica de la invención, las composiciones y los métodos convencionales para preparar y usar construcciones y células huésped son ampliamente conocidos para la persona versada en el arte. Los vectores típicos útiles para la expresión de ácidos nucleicos en plantas superiores son ampliamente conocidos en el arte e incluyen vectores derivados del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* y el vector de control de transferencia pCaMVCN.

Varios elementos reguladores pueden estar incluidos en una construcción, con inclusión de cualquiera de los provistos en la presente. Cualquiera de dichos elementos reguladores puede proveerse en combinación con otros elementos reguladores. Dichas combinaciones se pueden diseñar o modificar para producir características reguladoras deseables. En una forma de realización, las construcciones de la invención comprenden al menos un elemento regulador operativamente ligado a una molécula de ADN transcripible operativamente ligada a una 3' UTR.

Las construcciones de la invención pueden incluir cualquier promotor o líder provisto en la presente o conocido en el arte. Por ejemplo, un promotor de la invención puede estar operativamente ligado a un líder no traducido 5' heterólogo tal como el derivado de un gen de proteína de choque térmico. En forma alternativa, un líder de la invención puede estar operativamente ligado a un promotor heterólogo tal como el promotor del transcripto del virus del mosaico de la col 35S.

Los casetes de expresión también pueden incluir una secuencia codificadora de péptido de tránsito que codifica un péptido que es útil para el direccionamiento subcelular de una proteína operativamente ligada, particularmente un cloroplasto,

leucoplasto, u otro organelo plastídico; mitocondria; peroxisoma; vacuola; o una ubicación extracelular. Muchas proteínas localizadas en cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares como precursores y son dirigidas al cloroplasto por un péptido de tránsito de cloroplasto (CTP, del inglés *Chloroplast Transit Peptide*). Los ejemplos de dichas proteínas de cloroplastos aisladas incluyen, mas no se limitan a, las asociadas con la subunidad pequeña (SSU, del inglés *Small Subunit*) de ribulosa-1,5,-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, la proteína I y la proteína II del complejo de cosecha liviana, tioredoxina F, y enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS). Los péptidos de tránsito de cloroplastos se describen, por ejemplo, en la patente U.S. No. 7.193.133. Se ha demostrado que las proteínas no cloroplasto pueden ser dirigidas al cloroplasto mediante la expresión de un CTP heterólogo operativamente ligado al transgén que codifica una proteína no cloroplasto.

Moléculas de ADN transcriptibles

Tal como se usa en la presente, el término “molécula de ADN transcriptible” se refiere a cualquier molécula de ADN capaz de ser transcripta en una molécula de ARN, con inclusión, pero sin limitarse a las que tienen secuencias codificadoras de proteínas y las que producen moléculas de ARN que tienen secuencias útiles para la supresión de genes. El tipo de molécula de ADN puede incluir, mas 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 mensaje antisentido de un gen, o una molécula de ADN que codifica una versión artificial, sintética u otra versión modificada de otra manera de un transgen. Las moléculas de ADN transcriptible de ejemplo para la incorporación en construcciones de la invención incluyen, por ej., moléculas de ADN o genes de una especie distinta de la especie en la cual la molécula de ADN se incorpora o los genes que se originan a partir de, o están presentes en, la misma especie, pero

se incorporan en células receptoras mediante métodos de ingeniería genética en lugar de técnicas clásicas de reproducción.

Un “transgen” se refiere a una molécula de ADN transcriptible heteróloga a una célula huésped al menos con respecto a su ubicación en el genoma de la célula huésped y/o una molécula de ADN transcriptible artificialmente incorporada en el genoma de una célula huésped en la generación actual o en cualquier generación anterior de la célula.

Un elemento regulador, tal como un promotor de la invención, puede estar operativamente ligado a una molécula de ADN transcriptible que es heteróloga con respecto al elemento regulador. Tal como se usa en la presente, el término “heterólogo/a” 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 especies diferentes y/o las dos moléculas de ADN pueden derivar de genes diferentes, por ej., genes diferentes de la misma especie o genes iguales de especies diferentes. Un elemento regulador es, por ende, heterólogo con respecto a una molécula de ADN transcriptible operativamente ligada si dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza; es decir, la molécula de ADN transcriptible no aparece operativamente ligada al elemento regulador en forma natural.

La molécula de ADN transcriptible por lo general puede ser cualquier molécula de ADN para la cual se desea expresión de un transcripto. Dicha expresión de un transcripto puede generar la traducción de la molécula de ARNm resultante y, por ende, la expresión de proteínas. En forma alternativa, por ejemplo, una molécula de ADN transcriptible puede estar diseñada de tal manera que, en última instancia, cause la expresión reducida de un gen o proteína específicos. En una forma de realización, esto se puede lograr al usar una molécula de ADN transcriptible que está orientada en dirección antisentido. La persona versada en el arte está familiarizada con el uso de

dicha tecnología antisentido. Cualquier gen puede ser regulado en forma negativa de esta manera y, en una forma de realización, una molécula de ADN transcriptible puede estar diseñada para la supresión de un gen específico a través de la expresión de una molécula de dsARN, siARN o miARN.

Por ende, una forma de realización de la invención es una molécula de ADN recombinante que comprende un elemento regulador de la invención, tal como los provistos como SEQ ID NOs: 1–19 y 26, operativamente ligado a una molécula de ADN transcriptible heteróloga a fin de modular la transcripción de la molécula de ADN transcriptible a un nivel deseado o en un patrón deseado cuando la construcción se integra en el genoma de una célula vegetal transgénica. En una forma de realización, la molécula de ADN transcriptible comprende una región codificadora de proteína de un gen y, en otra forma de realización, la molécula de ADN transcriptible comprende una región antisentido de un gen.

Genes de interés agrónomo

Una molécula de ADN transcriptible puede ser un gen de interés agrónomo. Tal como se usa en la presente, el término “gen de interés agrónomo” se refiere a una molécula de ADN transcriptible que, cuando se expresa en un tejido, célula o tipo celular vegetal particular, confiere una característica deseable. El producto de un gen de interés agrónomo puede actuar dentro de la planta a fin de causar un efecto sobre la morfología, la fisiología, el crecimiento, el desarrollo, el rendimiento, la composición del grano, el perfil nutricional, la enfermedad o la resistencia a plagas, y/o el medio ambiente o la tolerancia química, o puede actuar como agente pesticida en la dieta de una plaga de insectos que se alimentan de la planta. En una forma de realización de la invención, un elemento regulador de la invención se incorpora en una construcción de tal manera que el elemento regulador esté operativamente ligado a una molécula de ADN transcriptible que es un gen de interés agrónomo. En una planta transgénica que contiene dicha construcción, la expresión del gen de interés agrónomo puede conferir

un rasgo agrónomo beneficioso. Un rasgo agrónomo beneficioso puede incluir, por ejemplo, mas no se limita a, tolerancia a herbicidas, control de insectos, rendimiento modificado, resistencia a enfermedades, resistencia a patógenos, crecimiento y desarrollo de la planta modificados, contenido de almidón modificado, contenido de aceite modificado, contenido de ácidos grasos modificado, contenido de proteínas modificado, maduración de la fruta modificada, nutrición animal y humana potenciada, producciones de biopolímeros, resistencia a estrés ambiental, péptidos farmacéuticos, calidad de procesamiento mejorada, sabor mejorado, utilidad de producción de semillas híbridas, producción de fibras mejorada y producción de biocombustibles deseable.

Los ejemplos no limitantes de genes de interés agrónomo conocidos en el arte incluyen los que tienen resistencia a herbicidas (Patentes U.S. Nos. 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 incrementado (Patentes U.S. Nos. 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 U.S. Nos. 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 U.S. Nos. 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 U.S. Nos. 6.617.496, 6.608.241, 6.015.940, 6.013.864, 5.850.023, y 5.304.730), resistencia a nematodos (Patente U.S. No. 6.228.992), resistencia a enfermedades bacterianas (Patente U.S. No. 5.516.671), crecimiento y desarrollo de la planta (Patentes U.S. Nos. 6.723.897 y 6.518.488), producción de almidón (Patentes U.S. Nos. 6.538.181, 6.538.179, 6.538.178, 5.750.876, 6.476.295),

PATENTE

MONS:464US

producción de aceites modificada (Patentes U.S. Nos. 6.444.876, 6.426.447 y 6.380.462), producción alta de aceites (Patentes U.S. Nos. 6.495.739, 5.608.149, 6.483.008, y 6.476.295), contenido de ácidos grasos modificado (Patentes U.S. Nos. 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 (Patente U.S. No. 6.380.466), maduración de la fruta (Patente U.S. No. 5.512.466), nutrición animal y humana potenciada (Patentes U.S. Nos. 6.723.837, 6.653.530, 6.5412.59, 5.985.605, y 6.171.640), biopolímeros (Patentes U.S. Nos. USRE37.543, 6.228.623, y 5.958.745, y 6.946.588), resistencia a estrés ambiental (Patente U.S. No. 6.072.103), péptidos farmacéuticos y péptidos secretables (Patentes U.S. Nos. 6.812.379, 6.774.283, 6.140.075, y 6.080.560), rasgos de procesamiento mejorados (Patente U.S. No. 6.476.295), digestibilidad mejorada (Patente U.S. No. 6.531.648), rafinosa baja (Patente U.S. No. 6.166.292), producción de enzimas industrial (Patente U.S. No. 5.543.576), sabor mejorado (Patente U.S. No. 6.011.199), fijación de nitrógeno (Patente U.S. No. 5.229.114), producción de semillas híbridas (Patente U.S. No. 5.689.041), producción de fibras (Patentes U.S. Nos. 6.576.818, 6.271.443, 5.981.834 y 5.869.720) y producción de biocombustible (Patente U.S. No. 5.998.700).

Alternativamente, un gen de interés agrónomo puede afectar las características o los fenotipos de la planta tal como se describió con anterioridad al codificar una molécula de ARN que causa la modulación dirigida de expresión génica de un gen endógeno, por ejemplo, mediante mecanismos antisentido (ver, por ej. la Patente U.S. 5.107.065); ARN inhibitorio ("ARNi," con inclusión de la modulación de expresión génica por mecanismos mediados por miARN, siARN, siARN de acción en trans, y sARN en fase, por ej., tal como se describen en las solicitudes publicadas U.S. 2006/0200878 y U.S. 2008/0066206, y en la solicitud de patente U.S. 11/974.469); o mecanismos mediados por co-supresión. El ARN también podría ser una molécula de ARN catalítica (por ej., una ribozima o *riboswitch*; véase, por ej., U.S. 2006/0200878)

diseñada para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. En el arte se conocen métodos para construir e introducir construcciones en una célula de tal manera que la molécula de ADN transcriptible se transcriba en una molécula que es capaz de causar la supresión génica.

Marcadores seleccionables

Los transgenes de marcadores seleccionables también se pueden usar 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 transcriptible cuya expresión en una planta, tejido o célula transgénicos, o falta de la misma, se puede cribar o puntuar de cierta manera. Los genes de marcadores seleccionables, y sus técnicas de selección y cribado asociadas, para uso en la práctica de la invención son conocidos en el arte e incluyen, mas no se limitan a, moléculas de ADN transcriptibles que codifican β -glucuronidasa (GUS), proteína fluorescente verde (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*), que confieren resistencia antibiótica, y proteínas que confieren tolerancia a herbicida. Se proporcionan ejemplos de transgenes marcadores seleccionables como SEQ ID NOs: 20 y 24.

Transformación de células

La invención también está dirigida a un método para producir células y plantas transformadas que comprenden uno o más elementos reguladores operativamente ligados a una molécula de ADN transcriptible.

El término “transformación” se refiere a la introducción de una molécula de ADN en un huésped receptor. Tal como se usa en la presente, el término “huésped” se refiere a bacterias, hongos, o plantas, con inclusión de células, tejidos, órganos o progenie de las bacterias, hongos, o plantas. Los tejidos y las células vegetales de particular interés incluyen protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, brotes, embriones y polen.

Tal como se usa en la presente, el término “transformada/o” se refiere a una célula, un tejido, un órgano o un organismo en el cual una molécula de ADN foráneo, tal como una construcción, ha sido introducida. La molécula de ADN introducida puede estar integrada en el ADN genómico de la célula, el tejido, el órgano o el organismo receptor, de tal manera que la molécula de ADN introducida sea heredada por la progenie posterior. Una célula o un organismo “transgénico/a” o “transformado/a” también pueden incluir la progenie de la célula o el organismo y la progenie producida a partir de un programa de reproducción que emplea dicho organismo transgénico como progenitor en una cruce y exhibe un fenotipo alterado generado por la presencia de una molécula de ADN foránea. La molécula de ADN introducida también puede introducirse de manera transitoria en la célula receptora de tal manera que la molécula de ADN introducida no sea heredada por la progenie posterior. El término “transgénica/a” se refiere a una bacteria, un hongo o una planta que contiene una o más moléculas de ADN heterólogas.

Existen muchos métodos ampliamente conocidos para las personas versadas en el arte para introducir moléculas de ADN en células vegetales. El proceso generalmente comprende los pasos de seleccionar una célula huésped adecuada, transformar la célula huésped con un vector, y obtener la célula huésped transformada. Los métodos y materiales para transformar las células vegetales al introducir una construcción vegetal en el genoma de la planta en la práctica de esta invención puede incluir cualquiera de los métodos ampliamente conocidos y demostrados. Los métodos adecuados incluyen, mas no se limitan a, infección bacteriana (por ej., *Agrobacterium*), vectores BAC binarios, suministro directo de ADN (por ej., mediante transformación mediada por PEG, captación de ADN mediada por disecación/inhibición, electroporación, agitación con fibras de carburo de silicio y aceleración de partículas revestidas de ADN), edición de genes (por ejemplo, sistemas CRISPR-Cas) entre otros.

Las células huésped pueden ser cualquier célula u organismo, tal como una célula vegetal, célula de alga, célula de hongo, hongo, célula bacteriana, o célula de insecto. En las formas de realización específicas, las células huésped y las células transformadas pueden incluir células de plantas de cultivo.

Una planta transgénica puede ser generada, posteriormente, a partir de una célula vegetal transgénica de la invención. Usando técnicas de reproducción convencionales o auto-polinización, la semilla puede ser producida a partir de esta planta transgénica. Dicha semilla, y la planta de progenie resultante que crece a partir de dicha semilla, contendrá la molécula de ADN recombinante de la invención, y por lo tanto será transgénica.

Las plantas transgénicas de la invención pueden ser auto-polinizadas para proveer semillas para las plantas transgénicas homocigotas de la invención (homocigotas para la molécula de ADN recombinante) o cruzadas con plantas no transgénicas o diferentes plantas transgénicas para proveer semillas para las plantas transgénicas heterocigotas de la invención (heterocigotas para la molécula de ADN recombinante). Ambas plantas transgénicas homocigotas y heterocigotas se denominan en la presente como “plantas de progenies.” Las plantas de progenies son plantas transgénicas que descienden de la planta transgénica original y contienen la molécula de ADN recombinante de la invención. Las semillas producidas usando una planta transgénica de la invención pueden ser cosechadas y usadas para cultivar generaciones de plantas transgénicas, es decir, plantas de progenies, de la invención, que comprenden la construcción de esta invención y expresan un gen de interés agrónomo. Las descripciones de los métodos de reproducción que comúnmente se usan para los diferentes cultivos se pueden encontrar en uno de los varios libros de referencia; véase, por ej., 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*, 2da Edición, Monografía, 16:249 (1987); Fehr, *Principles of Variety Development, Theory and Technique*, (Vol. 1) y *Crop Species Soybean* (Vol. 2), Universidad del Estado de Iowa, Macmillan Pub. Co., NY, 360–376 (1987).

Las plantas transformadas se pueden analizar en cuanto a la presencia del gen o los genes de interés y el nivel de expresión y/o perfil conferido por los elementos reguladores de la invención. Las personas versadas en el arte son concientes de los numerosos métodos disponibles para el análisis de las plantas transformadas. Por ejemplo, los métodos para el análisis de plantas incluyen, mas no se limitan a, Southern blots o Northern blots, enfoques basados en PCR, análisis bioquímicos, métodos de cribado fenotípico, evaluaciones de campo y ensayos inmunodiagnósticos. La expresión de una molécula de ADN transcriptible se puede medir usando reactivos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) y métodos tal como los describe el fabricante y tiempos de ciclos de PCR determinados usando TaqMan® Testing Matrix. En forma alternativa, los reactivos Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) y los métodos tal como los describe el fabricante se pueden usar para evaluar la expresión transgénica.

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

La invención también proporciona un producto básico que se produce a partir de una planta transgénica o parte de la misma 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 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-19 y SEQ ID NO: 26. Como se usa en la presente, un "producto básico" se refiere a cualquier composición o producto que se compone de 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 básicos incluyen, pero sin limitación, semillas procesadas, granos, partes de plantas y harina. 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 se puede usar para determinar el contenido o la fuente del producto básico. Se puede usar cualquier método estándar de detección de moléculas de ADN, que incluyen los métodos de detección descritos en la presente.

La invención puede entenderse de manera más fácil por medio de la referencia a los siguientes ejemplos, que se proveen a modo de ilustración y no están destinados a limitar la invención, a menos que así se especifique. Debería ser advertido por las personas versadas en el arte que las técnicas reveladas en los siguientes ejemplos representan técnicas que, según lo descubierto por los inventores, funcionan bien en la práctica de la invención. No obstante, las personas versadas en el arte deberían apreciar, a la luz de la presente divulgación, que es posible realizar muchos cambios en las formas de realización específicas que son divulgadas y aún así obtener un resultado igual o similar sin alejarse del espíritu y alcance de la invención; por lo tanto, todo lo establecido o ilustrado en los dibujos adjuntos ha de interpretarse en sentido ilustrativo y no restrictivo.

EJEMPLOS**Ejemplo 1****Diseño, Síntesis y clonación de los elementos reguladores sintéticos**

Los nuevos elementos reguladores transcripcionales sintéticos son elementos sintéticos de expresión diseñados mediante métodos algorítmicos. Estos elementos reguladores diseñados computacionalmente se sintetizaron químicamente y se clonaron para formar grupos de elementos de expresión (EXP). Se diseñaron y analizaron más de 1,000 elementos reguladores sintéticos en protoplastos de maíz y plantas de maíz transformadas de manera estable para identificar aquellos elementos reguladores sintéticos que proporcionaban las características deseadas, tales como los niveles de expresión de proteínas y los patrones de expresión. Los elementos sintéticos de la presente invención proporcionan diversos patrones de expresión constitutiva útiles para impulsar la expresión de muchas secuencias codificadoras diferentes y ARN interferentes de interés agronómico.

Los elementos reguladores transcripcionales sintéticos diseñados no tienen una homología extendida con ninguna secuencia de ácido nucleico conocida que exista en la naturaleza, pero afectan la transcripción de una secuencia codificadora operativamente ligado de la misma manera que los promotores, líderes, intrones y 3' UTR naturales. Los EXP sintéticos y sus correspondientes promotores, líderes e intrones sintéticos, así como las 3' UTRs sintéticas se presentan en la Tabla 1. Los EXP sintéticos se clonaron usando métodos conocidos en la técnica en vectores de transformación de plantas binarias, operablemente ligados a una secuencia codificadora de β -glucuronidasa (GUS), y se evaluaron los niveles y patrones de expresión en plantas de maíz transformadas de forma estable.

El análisis del TSS de elementos reguladores y uniones de empalme intrón/exón usando tejido de planta transformada. Brevemente, las plantas se transformaron con los vectores de expresión en plantas que comprenden los fragmentos de ADN clonados operativamente ligados a una molécula de ADN transcriptible heteróloga. A continuación, se usó el 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Versión 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, California 92008) para confirmar el TSS de elementos

reguladores y las uniones de empalme intrón/exón al analizar la secuencia de los transcritos de ARN mensajero (ARNm) producidos de esta manera. Los 3' UTR sintéticos se caracterizaron por su efecto sobre la expresión génica, así como por la terminación adecuada del transcripto.

Además de los elementos de expresión sintéticos, se proporciona una nueva 3' UTR endógena derivada del gen de la proteína de transferencia de lípidos no específica 4 *Sorghum bicolor*, T-Sb.Nltp4-1: 1: 2, y se proporciona en la presente como SEQ ID NO:19. T-Sb.Nltp4-1:1:2 se caracterizó de manera similar a las 3' UTR sintéticas. **Tabla 1. Grupos de elementos de expresión reguladores transcripcionales, promotores, líderes, intrones y 3' UTR sintéticos.**

Anotación	SEQ ID NO:	Tamaño (bp)	Descripción y/o elementos reguladores de EXP ligado en dirección 5' → 3' (SEQ ID NOs):
EXP-Zm.GSP850	1	500	EXP: P-Zm.GSP850.nno:4 (SEQ ID NO:2), L-Zm.GSP850.nno:3 (SEQ ID NO:3)
P-Zm.GSP850.nno:4	2	450	Promotor
L-Zm.GSP850.nno:3	3	50	Líder
EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI 153.nno:2	4	1117	EXP: P-Zm.GSP850.nno:4 (SEQ ID NO:2), L-Zm.GSP850.nno:3 (SEQ ID NO:3), I-Zm.GSI153.nno:1 (SEQ ID NO:5)
I-Zm.GSI153.nno:1	5	610	Intrón
EXP-Zm.GSP990	6	500	EXP: P-Zm.GSP990.nno:2 (SEQ ID NO:7), L-Zm.GSP990.nno:1 (SEQ ID NO:8)
P-Zm.GSP990.nno:2	7	450	Promotor
L-Zm.GSP990.nno:1	8	50	Líder
EXP-Zm.GSP990.nno+Zm.GSI 197.nno:2	9	1117	EXP: P-Zm.GSP990.nno:2 (SEQ ID NO:7), L-Zm.GSP990.nno:1 (SEQ ID NO:8), I-Zm.GSI197.nno:1 (SEQ ID NO:10)
I-Zm.GSI197.nno:1	10	610	Intrón
EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI 140.nno:1	11	1117	EXP: P-Zm.GSP850.nno:4 (SEQ ID NO:2), L-Zm.GSP850.nno:3 (SEQ ID NO:3), I-Zm.GSI140.nno:1 (SEQ ID NO:12)

I-Zm.GSI140.nno:1	12	610	Intrón
T-Zm.GST9.nno:2	13	300	3' UTR
T-Zm.GST18.nno:2	14	400	3' UTR
EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.DnaK:1	15	1311	EXP: P-Zm.GSP850.nno:4 (SEQ ID NO:2), L-Zm.GSP850.nno:3 (SEQ ID NO:3), I-Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:22)
EXP-Zm.GSP990.nno+Zm.DnaK:1	16	1311	EXP: P-Zm.GSP990.nno:2 (SEQ ID NO:7), L-Zm.GSP990.nno:1 (SEQ ID NO:8), I-Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:22)
E-Zm.GSP850	17	418	Potenciador
E-Zm.GSP990	18	416	Potenciador
T-Zm.GST43.nno:1	26	300	3' UTR

Ejemplo 2

Análisis de los elementos reguladores sintéticos que dirigen GUS en protoplastos de hoja de maíz

Los protoplastos de la hoja de maíz se transformaron con vectores, específicamente vectores de expresión que contienen un elemento regulador de prueba que dirige la expresión del transgén β -glucuronidasa (GUS). Los protoplastos de hoja de maíz transformados resultantes se analizaron para determinar la expresión de la proteína GUS para evaluar el efecto de los elementos reguladores seleccionados sobre la expresión.

Los protoplastos de maíz, derivados del tejido de la hoja, se transformaron con vectores de expresión que comprenden elementos de expresión sintéticos. El nivel y patrón de expresión de estos vectores de elementos de expresión sintéticos en protoplastos de maíz se comparó con el nivel y patrón de expresión de elementos de expresión conocidos en la técnica. Se realizaron experimentos por separado para evaluar la actividad de los EXP, EXP-Zm.GSP850 (SEQ ID NO: 1) y EXP-Zm.GSP990 (SEQ ID NO: 6), los intrones I-Zm.GSI153.nno: 1 (SEQ ID NO: 5) e I-Zm.GSI197.nno: 1 (SEQ ID NO: 10), y las 3' UTR's, T-Zm.GST9.nno: 2 (SEQ ID NO: 13) y T-Zm.GST18.nno: 2 (SEQ ID NO: 14). Los elementos de expresión se clonaron en vectores de expresión y se ligaron operativamente a una secuencia codificadora GUS, GOI-Ec.uidA + St.LS1: 1: 1 (SEQ ID NO: 24), que comprendía un intrón procesable. Los vectores de expresión de control comprendían diferentes configuraciones de elementos

de expresión conocidos que variaban de acuerdo con el tipo de elemento que se estaba evaluando (EXP, Intrón o 3' UTR). También se construyó un plásmido usado en la co-transformación de los protoplastos y la normalización de los datos usando métodos conocidos en la técnica. Comprendió un casete transgénico compuesto por el EXP, EXP-CaMV.35S (SEQ ID NO: 21) operativamente ligado 5' a una secuencia codificadora que codifica la proteína fluorescente luciferasa NanoLuc® (Promega, Madison, WI 53711), en la presente denominado como Nluc (SEQ ID NO: 25), que estaba operativamente ligado 5' a una 3' UTR, T-Os.LTP: 1 (SEQ ID NO: 23).

Los protoplastos de la hoja de maíz se transformaron usando un método de transformación basado en PEG, similar a los conocidos en la técnica. Las células de protoplastos se transformaron en un formato de noventa y seis (96) pocillos. Doce (12) microgramos del ADN del vector de prueba o ADN del vector de control, y seis (6) microgramos del ADN del vector NanoLuc® se usaron para transformar $3,2 \times 10^5$ protoplastos por pocillo. Después de la transformación, los protoplastos se incubaron a 25 °C en la oscuridad durante dieciséis a veinte horas. Después de la incubación, los protoplastos se lisaron y el lisado se usó para medir la expresión de luciferasa y GUS. Para lisar las células, las células en la placa se sedimentaron mediante centrifugación, se lavaron, se resuspendieron en un volumen más pequeño y se transfirieron a tiras de tubos de pocillos. Los tubos se centrifugaron nuevamente y se aspiró el sobrenadante dejando atrás el sedimento de células protoplastos. El sedimento celular se resuspendió en buffer QB (KPO₄ 100 mM, pH 7,8; EDTA 1 mM; Triton X-100 1%; Glicerol 10%; DTT 1 mM). Las células se lisaron mediante el pipeteo vigoroso de las células varias veces, se agitaron los tubos y dejaron que los tubos se incuben en hielo durante cinco minutos. El lisado se centrifugó luego para sedimentar los restos celulares. El lisado resultante se transfirió luego a una placa limpia.

La actividad de luciferasa se ensayó usando el sustrato de ensayo de luciferasa Nano-Glo® (Promega, Madison, WI 53711) en buffer QB. En resumen, se mezcló un pequeño volumen de lisado, buffer QB y la solución sustrato de ensayo luciferasa Nano-Glo®/QB en placas blancas de noventa y seis (96) pocillos. Luego se midió la fluorescencia usando un lector de placas PHERAstar® (BMG LABTECH Inc., Cary, NC 27513).

La actividad de GUS se ensayó usando el sustrato fluorogénico 4-metileumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) en un volumen de reacción total de cincuenta (50) microlitros. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), es máximamente fluorescente a pH alto, donde el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de una solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente. Se mezcló una alícuota de lisado con una alícuota de MUG disuelta en buffer QB y se incubó a 37 ° C. Se extrajo una pequeña alícuota de la mezcla de reacción lisado/MUG y se añadió a un buffer de detención en tres puntos de tiempo diferentes: (1) inmediatamente después de mezclar la reacción lisado/MUG como "Tiempo cero minutos"; (2) veinte minutos; y (3) sesenta minutos. La fluorescencia se midió con excitación a 355 nm, emisión a 460 nm usando un lector de placas PHERAstar[®] (BMG LABTECH Inc., Cary, NC 27513). El nivel de expresión se expresa como "nM MUG hidrolizado" que se deriva de la curva estándar en placa.

Para cada placa, cada constructo se transforma en cuatro (4) a ocho (8) pocillos. Se extrajo una alícuota de cada transformación para el ensayo MUG y se derivó "nM MUG hidrolizado" de la curva estándar en placa. También se tomó una alícuota de cada transformación para la lectura de NanoLuc[®] (NanoLuc[®] RLU). La media de MM nU hidrolizada/NanoLuc[®] RLU para cada constructo se normalizó con respecto al constructo EXP-CaMV.35S/I-Zm.DnaK: 1/T-Os.LTP: 1 que se ajustó a 100%.

Análisis de la expresión de GUS en protoplastos de hoja de maíz dirigido por el EXP sintético, EXP-Zm.GSP850

Las células de protoplastos de la hoja de maíz se transformaron con vectores de expresión que se construyeron usando métodos conocidos en la técnica que comprenden elementos de expresión que dirigen la expresión de GUS. Dos (2) vectores de expresión de prueba comprendieron casetes transgénicos que comprenden el EXP sintético, EXP-Zm.GSP850 (SEQ ID NO: 1). El EXP-Zm.GSP850 sintético está compuesto por un promotor sintético, P-Zm.GSP850.nno: 4 (SEQ ID NO: 2), operativamente ligado 5' a un líder sintético, L-Zm.GSP850.nno: 3 (SEQ ID NO: 3). El primer vector de prueba comprendía EXP-Zm.GSP850, operativamente ligado 5' a una secuencia codificadora que codifica GUS (SEQ ID NO: 24) que comprendía un intrón procesable, que estaba operativamente ligado 5' a 3' UTR, T-Os. LTP: 1 (SEQ ID NO:

23). El segundo casete transgénico comprendía EXP-Zm.GSP850, operativamente ligado 5' al intrón I-Zm.DnaK: 1 (SEQ ID NO: 22), operativamente ligado 5' a la secuencia codificadora de US, que estaba operativamente ligado 5' a la 3' UTR, T-Os.LTP: 1.

También se construyeron tres (3) vectores de expresión de control y se usaron para transformar protoplastos de hoja de maíz. El primer vector de expresión de control comprendía un casete transgénico sin promotor y estaba compuesto por el intrón, I-Zm.DnaK: 1, operativamente ligado 5' a la secuencia codificadora GUS, que estaba operativamente ligada 5' a 3' UTR, T-Os.LTP: 1. El segundo vector de control comprendía un casete de transgén sin intrones y estaba compuesto por el EXP, EXP-CaMV.35S (SEQ ID NO: 21), operativamente ligado 5' a la secuencia codificadora GUS, que estaba operativamente ligada 5' al 3' UTR, T-Os.LTP: 1. El tercer vector de control comprendía un casete transgénico que comprendía el EXP, EXP-CaMV.35S, operativamente ligado 5' al intrón I-Zm.DnaK: 1, operativamente ligado 5' a la secuencia codificadora GUS, que estaba operativamente ligada 5' al 3' UTR, T-Os.LTP: 1.

Los protoplastos de la hoja de maíz se transformaron con los cinco (5) vectores. La transformación y lisis de las células protoplastos se realizaron como se describe en la presente. La expresión de luciferasa y GUS se ensayó como se describe en la presente. La Tabla 2 muestra la expresión media de GUS ensayada y se expresa como un porcentaje de expresión con respecto al tercer vector de expresión de control que comprende EXP-CaMV.35S y I-Zm.DnaK: 1 que dirige GUS.

Tabla 2. % Expresión de GUS media de protoplastos de la hoja de maíz transformad con vectores de prueba y control

Placa ID	Promotor	Intrón	Media	SD	Reps
39	No Promotor	I-Zm.DnaK:1	0.1	0.337	6
54	No Promotor	I-Zm.DnaK:1	0.4	0.315	8
95	No Promotor	I-Zm.DnaK:1	0.1	0.534	8
103	No Promotor	I-Zm.DnaK:1	0.5	0.149	8
39	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	48.3	2.018	6

Placa ID	Promotor	Intrón	Media	SD	Reps
54	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	46.5	3.949	8
95	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	46.8	4.369	8
103	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	40	3.333	8
39	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	100	5.117	6
54	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	100	6.465	8
95	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	100	18.603	8
103	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	100	5.164	8
95	EXP-Zm.GSP850	Sin intrón	14	1.844	8
103	EXP-Zm.GSP850	Sin intrón	8.4	0.336	8
39	EXP-Zm.GSP850	I-Zm.DnaK:1	19	0.732	4
54	EXP-Zm.GSP850	I-Zm.DnaK:1	22	1.954	8

Como se puede ver en la Tabla 2 anterior, EXP-Zm.GSP850 (SEQ ID NO: 1) fue capaz de dirigir la expresión del transgén GUS en protoplastos de hoja de maíz en comparación con las células de protoplastos de hoja de maíz transformadas con un constructo sin promotor.

Análisis de la expresión de GUS en protoplastos de la hoja de maíz dirigido por el EXP sintético, EXP-Zm.GSP990.

Las células de protoplastos de la hoja de maíz se transformaron con vectores de expresión que se construyeron usando que comprenden elementos de expresión que dirigen la expresión de GUS. Un vector de expresión de prueba compuesto de un casete transgénico que estaba compuesto del EXP sintético, EXP-Zm.GSP990 (SEQ ID NO:6), operativamente ligado 5' al intrón I-Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:22), operativamente ligado 5' a una secuencia codificadora que codifica GUS (SEQ ID NO:20), que estaba operativamente ligado 5' a la 3' UTR, T-Os.LTP:1. El EXP-Zm.GSP990 sintético (SEQ ID NO:6) está compuesto de un promotor sintético, P-

MONS:464US

Zm.GSP990.nno:2 (SEQ ID NO:7), operativamente ligado 5' a un líder sintético, L-Zm.GSP990.nno:1 (SEQ ID NO:8). Tres vectores de expresión de control también se transformaron en protoplastos de la hoja de maíz y se construyeron como se describió anteriormente. La Tabla 3 muestra el % de expresión media con respecto al tercer vector de expresión control que comprende EXP-CaMV.35S y I-Zm.DnaK:1 que dirige GUS.

Tabla 3. % Expresión GUS media de protoplastos de la hoja de maíz transformadas con vectores de prueba y control.

Placa ID	Promotor	Intrón	Media	SD	Reps
71	No Promotor	I-Zm.DnaK:1	0.3	0.125	6
108	No Promotor	I-Zm.DnaK:1	-0.6	1.211	8
71	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	45.1	7.791	6
108	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	39.9	2.636	8
71	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	100	13.591	6
108	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	100	7.425	8
71	EXP-Zm.GSP990	I-Zm.DnaK:1	52.3	13.658	4
108	EXP-Zm.GSP990	I-Zm.DnaK:1	45.2	5.468	8

Como se puede observar en la Tabla 3, EXP-Zm.GSP990 (SEQ ID NO:6) pudo dirigir la expresión del transgén GUS en protoplastos de la hoja de maíz cuando se compararon con células de protoplastos de maíz transformadas con un constructo sin promotor.

Análisis de la potenciación de la expresión de US mediante el intrón sintético, I-Zm.GSI153.nno:1

Las células de protoplastos de la hoja de maíz se transformaron con vectores de expresión que se construyeron usando que comprenden elementos de expresión que dirigen la expresión de GUS. Un vector de expresión de prueba se usó para ensayar la potenciación de la expresión de GUS a partir del intrón sintético, I-Zm.GSI153.nno:1 (SEQ ID NO:5), dirigido por EXP-CaMV.35. El casete transgénico estaba compuesto

del EXP, EXP-CaMV.35 operativamente ligado 5' al intrón sintético, I-Zm.GSI153.nno:1 (SEQ ID NO:5), operativamente ligado 5' a una secuencia codificadora que codifica GUS (SEQ ID NO:24), que estaba operativamente ligado 5' a la 3' UTR, T-Os.LTP:1. Dos vectores de expresión control también se construyeron y se usaron para transformar protoplastos de la hoja de maíz. El primer vector de expresión control estaba compuesto de un casete transgénico sin intrón y estaba compuesto del EXP, EXP-CaMV.35S, operativamente ligado 5' a la secuencia codificadora de GUS, que estaba operativamente ligado 5' a la 3' UTR, T-Os.LTP:1. El segundo vector de control estaba compuesto de un casete transgénico que estaba compuesto del EXP, EXP-CaMV.35S, operativamente ligado 5' al intrón I-Zm.DnaK:1, operativamente ligado 5' a la secuencia codificadora de GUS, que estaba operativamente ligado 5' a la 3' UTR, T-Os.LTP:1. La Tabla 4 muestra el % de expresión media con respecto al segundo vector de expresión control que comprende EXP-CaMV.35S y I-Zm.DnaK:1 que dirige GUS.

Tabla 4. % Expresión GUS media de protoplastos de la hoja de maíz transformados con vectores de prueba y control.

Placa ID	Promotor	Intrón	Media	SD	Reps
10	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	52.8	8.428	6
13	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	44.4	4.586	8
10	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	100	16.646	6
13	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	100	13.123	8
10	EXP-CaMV.35S	I-Zm.GSI153.nno:1	83	5.601	4
13	EXP-CaMV.35S	I-Zm.GSI153.nno:1	83.6	7.596	8

Como se puede observar en la Tabla 4, el intrón sintético, I-Zm.GSI153.nno:1 (SEQ ID NO:5), potenció la expresión del transgén GUS potenciado en protoplastos de la hoja de maíz dirigido por el EXP-CaMV.35S cuando se comparó con el vector de expresión control sin intrón.

Análisis de la potenciación de la expresión de GUS by the intrón sintético, I-Zm.GSI197.nno:1

Las células de protoplastos de la hoja de maíz se transformaron con vectores de expresión que se construyeron usando que comprenden elementos de expresión que dirigen la expresión de GUS. Un vector de expresión de prueba se usó para ensayar la potenciación de la expresión de GUS a partir del intrón sintético, I-Zm.GSI197.nno:1 (SEQ ID NO:10), dirigido por EXP-CaMV.35. El casete transgénico estaba compuesto del EXP, EXP-CaMV.35 operativamente ligado 5' al intrón sintético, I-Zm.GSI197.nno:1, operativamente ligado 5' a una secuencia codificadora que codifica GUS (SEQ ID NO:24), que estaba operativamente ligado 5' a la 3' UTR, T-Os.LTP:1. Tres vectores de expresión de control también se construyeron y usaron para transformar los protoplastos de la hoja de maíz. El primer vector de expresión control estaba compuesto de un casete transgénico sin promotor y estaba compuesto del intrón, I-Zm.DnaK:1, operativamente ligado 5' a la secuencia codificadora de GUS, que estaba operativamente ligado 5' a la 3' UTR, T-Os.LTP:1. El segundo vector de control estaba compuesto de un casete transgénico sin intrón y estaba compuesto del EXP, EXP-CaMV.35S, operativamente ligado 5' a la secuencia codificadora de GUS, que estaba operativamente ligado 5' a la 3' UTR, T-Os.LTP:1. El tercer vector control estaba compuesto de un casete transgénico que estaba compuesto del EXP, EXP-CaMV.35S, operativamente ligado 5' al intrón I-Zm.DnaK:1, operativamente ligado 5' a la secuencia codificadora de GUS, que estaba operativamente ligado 5' a la 3' UTR, T-Os.LTP:1. La Tabla 5 muestra el % de expresión media con respecto al tercer vector de expresión control que comprende los EXP-CaMV.35S y I-Zm.DnaK:1 que dirige GUS.

Tabla 5. % Expresión GUS media de protoplastos de la hoja de maíz transformado con los vectores de prueba y control.

Placa ID	Promotor	Intrón	Media	SD	Reps
125	No Promotor	I-Zm.DnaK:1	1.1	0.317	6
146	No Promotor	I-Zm.DnaK:1	0.6	0.101	8
125	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	43.8	4.081	6
146	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	41	3.666	8

125	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	100	11.287	6
146	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	100	8.506	8
125	EXP-CaMV.35S	I-Zm.GSI197.nno:1	150	12.451	4
146	EXP-CaMV.35S	I-Zm.GSI197.nno:1	109.8	8.001	8

Como se puede observar en la Tabla 5, el intrón sintético, I-Zm.GSI197.nno:1 (SEQ ID NO:10), potenció la expresión del transgén GUS en protoplastos de la hoja de maíz dirigido por EXP-CaMV.35S cuando se compara con el vector de expresión control sin promotor. La potenciación de expresión fue mayor que la impartida por el intrón, I-Zm.DnaK:1 cuando se comparó con el tercer vector de expresión control que estaba compuesto del EXP, EXP-CaMV.35S, operativamente ligado 5' al intrón I-Zm.DnaK:1.

Análisis de la potenciación de la expresión de GUS por las 3' UTRs sintéticas, T-Zm.GST9.nno:2 y T-Zm.GST18.nno:2.

Las células de protoplastos de la hoja de maíz se transformaron con vectores de expresión que se construyeron usando que comprenden elementos de expresión que dirigen la expresión de GUS. Dos vectores de prueba estaban compuestos de un casete transgénico usados para la potenciación del análisis de la expresión de GUS impartida por las 3' UTR, T-Zm.GST9.nno:2 (SEQ ID NO:13) y T-Zm.GST18.nno:2 (SEQ ID NO:14) y estaban compuestos de EXP-CaMV.35S operativamente ligado 5' al intrón I-Zm.DnaK:1, operativamente ligado 5' a una secuencia codificadora que codifica GUS (SEQ ID NO:24), que estaba operativamente ligado 5' a la 3' UTR, T-Zm.GST9.nno:2 (SEQ ID NO:13) o la 3' UTR, T-Zm.GST18.nno:2 (SEQ ID NO:14). Tres vectores de expresión de control también se construyeron, como se describió anteriormente, y se usaron para transformar protoplastos de la hoja de maíz. La Tabla 6 muestra el % de expresión media con respecto al tercer vector de expresión control que comprende EXP-CaMV.35S y I-Zm.DnaK:1 que dirige GUS.

Tabla 6. % Expresión GUS media de protoplastos de la hoja de maíz transformados con los vectores de prueba y control.

Placa ID	Promotor	Intrón	3' UTR	Media	SD	Reps
119	No Promotor	I-Zm.DnaK:1	T-Os.LTP:1	3.5	2.163	8
184	No Promotor	I-Zm.DnaK:1	T-Os.LTP:1	0.1	0.205	6
185	No Promotor	I-Zm.DnaK:1	T-Os.LTP:1	0	0.331	8
328	No Promotor	I-Zm.DnaK:1	T-Os.LTP:1	10.2	3.017	6
119	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	T-Os.LTP:1	45.5	3.729	8
184	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	T-Os.LTP:1	33.7	2.719	6
185	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	T-Os.LTP:1	33.6	2.576	8
328	EXP-CaMV.35S	Sin intrón	T-Os.LTP:1	48.8	3.69	6
119	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	T-Os.LTP:1	100	7.305	8
184	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	T-Os.LTP:1	100	6.91	6
185	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	T-Os.LTP:1	100	6.308	8
328	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	T-Os.LTP:1	100	5.989	6
184	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	T-Zm.GST9.nno:2	202.5	17.58 2	4
119	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	T-Zm.GST18.nno:2	483.2	40.61 3	8
185	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	T-Zm.GST18.nno:2	254.5	18.34 7	8
328	EXP-CaMV.35S	I-Zm.DnaK:1	T-Zm.GST18.nno:2	307.4	17.77 2	4

Como se puede observar en la Tabla 6, las 3' UTR, T-Zm.GST9.nno:2 (SEQ ID NO:13) y T-Zm.GST18.nno:2 (SEQ ID NO:14) potenciaron la expresión de GUS con respecto a los controles en los protoplastos de la hoja de maíz.

Ejemplo 3

Análisis de la expresión de GUS dirigida por los EXP sintéticos, EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI153.nno:2 y EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI140.nno:1 en plantas de maíz de la variedad LH244 transformadas en forma estables

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

Las plantas de maíz se transformaron con constructos de expresión de GUS de planta. Los elementos reguladores se clonaron en un vector de expresión de planta base usando métodos estándares conocidos en la técnica. Los vectores de expresión de plantas resultantes contenían una región límite izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens* (límite B-AGRtu.left), un primer casete de selección transgénica utilizado para la selección de células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato; un segundo casete transgénico para evaluar la actividad de los elementos reguladores sintéticos, que estaba compuesto del EXP sintético, EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI153.nno:2 (SEQ ID NO:4) o EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI140.nno:1 (SEQ ID NO:11) operativamente ligado 5' a una secuencia codificadora sintética diseñada para la expresión en una célula vegetal que codifica la β -glucuronidasa (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1, SEQ ID NO:20) que contiene un intrón procesable derivado del gen ST-LS1 específico de tejido inducible por luz de papa (Acceso Genbank: X04753), operativamente ligado 5' a una región de terminación 3', T-Sb.Nltp4-1:1:2 (SEQ ID NO:19); y una región límite derecha de *Agrobacterium tumefaciens* (límite B-AGRtu.right). El EXP sintético, EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI153.nno:2 (SEQ ID NO:4) está compuesto de un promotor sintético, P-Zm.GSP850.nno:4 (SEQ ID NO:2), operativamente ligado 5' a un líder sintético, L-Zm.GSP850.nno:3 (SEQ ID NO:3), que está operativamente ligado 5' a un intrón sintético, I-Zm.GSI153.nno:1 (SEQ ID NO:5). El EXP sintético, EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI140.nno:1 (SEQ ID NO:11) está compuesto de un promotor sintético, P-Zm.GSP850.nno:4 (SEQ ID NO:2), operativamente ligado 5' a un líder sintético, L-Zm.GSP850.nno:3 (SEQ ID NO:3), que está operativamente ligado 5' a un intrón sintético, I-Zm.GSI140.nno:1 (SEQ ID NO:12).

Las células vegetales de la variedad de maíz LH244 se transformaron usando el constructo del vector de transformación binaria descrito anteriormente por transformación mediada por *Agrobacterium* como bien se conoce en la técnica. Las

células vegetales transformadas resultantes fueron inducidas a formar plantas de maíz enteras.

El análisis cualitativo y cuantitativo de GUS se utilizó para evaluar la actividad del elemento de expresión en órganos y tejidos vegetales seleccionados en plantas transformadas. Para el análisis cualitativo de la expresión de GUS por tinción histoquímica, se incubaron tejidos de montaje completo o seccionados con solución de tinción de GUS que contiene 1 mg/ml de X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucuronido) durante 5 ha 37 °C y se decolora con EtOH 35% y ácido acético 50%. La expresión de GUS se determinó cualitativamente mediante inspección visual de órganos o tejidos vegetales seleccionados para la coloración azul bajo un microscopio de disección o compuesto.

Para el análisis cuantitativo de la expresión de GUS mediante ensayos enzimáticos, se extrajo la proteína total de tejidos seleccionados de plantas de maíz transformadas. Se incubaron uno o dos microgramos de proteína total con el sustrato fluorogénico, 4-metilembeliferil- β -D-glucuronido (MUG) a una concentración de 1 mM en un volumen de reacción total de 50 microlitros. Después de 1 h de incubación a 37 °C, la reacción se detuvo mediante la adición de 350 microlitros de solución de bicarbonato de sodio 200 mM. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), es máximamente fluorescente a pH alto, donde el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de la solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente 4-MU. La cantidad de 4-MU formada se estimó mediante la medición de su fluorescencia usando un lector de microplacas Omega FLUOstar (BMG LABTECH) (excitación a 355 nm, emisión a 460 nm). Los valores de actividad de GUS se proporcionan en nmoles de proteína total 4-MU/hora/mg.

Se tomaron muestras de los siguientes tejidos para determinar la expresión de GUS en la generación R0: etapa V4 hoja y raíz; Etapa V7 Hoja y Raíz; Etapa VT Hoja, Raíz y Flor/Antera; Etapa R1 mazorca/estigma y etapa R3 embrión de semilla y endospermo de semilla 21 días después de la polinización (DAP). La Tabla 7 muestra los valores de expresión GUS cuantitativos medios para cada una de los EXP sintéticos.

Tabla 7. Expresión cuantitativa media de GUS en plantas de maíz de variedad LH244 transformadas en forma estable dirigida por los EXP sintéticos, EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI153.nno:2 y EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI140.nno:1.

Etapa	Órgano	EXP- Zm.GSP850.nno+Zm.GSI15 3.nno:2 (SEQ ID NO:4)	EXP- Zm.GSP850.nno+Zm.GSI1 40.nno:1 (SEQ ID NO:11)
V4	Hoja	694	642
	Raíz	870	116
V7	Hoja	1423	1265
	Raíz	476	521
VT	Hoja	2646	344
	Raíz	424	70
	Flor/antera	5465	1267
R1	Mazorca/estigma	3618	1116
R3	Embrión de semilla 21		
	DAP	260	224
	Endospermo de semilla 21 DAP	2648	1140

Como se puede ver en la Tabla 7, el promotor y líder sintético GSP850 (P-Zm.GSP850.nno: 4 (SEQ ID NO: 2) y L-Zm.GSP850.nno: 3 (SEQ ID NO: 3)) dirigió la expresión constitutiva de GUS en plantas de maíz de variedad LH244 transformadas en forma estable. El análisis molecular del sitio de inicio de la transcripción demostró un TSS consistente para el promotor y líder GSP850. Los intrones sintéticos, I-Zm.GSI153.nno: 1 (SEQ ID NO: 5) e I-Zm.GSI140.nno: 1 (SEQ ID NO: 12) afectaron la expresión de manera diferente en los diferentes tejidos muestreados. El análisis molecular de los sitios de empalme de intrón demostró el procesamiento consistente de los intrones sintéticos. La potenciación general de la expresión de GUS fue mayor en la mayoría de las muestras de tejido de plantas que comprenden I-Zm.GSI153.nno: 1 (SEQ ID NO: 5), con la excepción de la hoja en etapa V4, la raíz en etapa V7 y el embrión de semilla R3 donde los niveles de expresión de GUS fueron relativamente similares. La potenciación de la expresión impartida por I-Zm.GSI153.nno: 1 (SEQ ID NO: 5) en relación con I-Zm.GSI140.nno: 1 (SEQ ID NO: 12) fue aproximadamente 7.5 veces mayor en la raíz V4, 7.7 veces más alta en hoja VT, 6.0 veces más alta en la raíz

VT, 4.3 veces más alta en la flor/antera VT, 3.2 veces más alta en la mazorca/estigma R1 y 2.3 veces más alta en el endospermo de la semilla R3.

Ejemplo 4

Análisis de la expresión de GUS dirigida por los EXP sintéticos EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.DnaK:1, EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI153.nno:2, y EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI140.nno:1 en plantas de maíz de variedad 1DKD2 transformadas en forma estable

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

Las plantas de maíz se transformaron con constructos de expresión de GUS de planta. Los elementos reguladores se clonaron en un vector de expresión de planta base usando métodos estándares conocidos en la técnica. Los vectores de expresión de plantas resultantes contenían una región límite izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens* (límite B-AGRtu.left), un primer casete de selección transgénica utilizado para la selección de células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato; un segundo casete transgénico para evaluar la actividad de los elementos reguladores, que estaba compuesto del EXP sintético, EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:15), EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI153.nno:2 (SEQ ID NO:4) or EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI140.nno:1 (SEQ ID NO:11) operativamente ligado 5' a una secuencia codificadora sintética diseñada para la expresión en una célula vegetal que codifica la β -glucuronidasa (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1, SEQ ID NO:20) que contiene un intrón procesable derivado del gen ST-LS1 específico de tejido inducible por luz de papa (Acceso Genbank: X04753), operativamente ligado 5' a una región de terminación 3', T-Sb.Nltp4-1:1:2 (SEQ ID NO:19); y una región límite derecha de *Agrobacterium tumefaciens* (límite B-AGRtu.right). El EXP sintético, EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:15) está compuesto de un promotor

MONS:464US

sintético, P-Zm.GSP850.nno:4 (SEQ ID NO:2), operativamente ligado 5' a un líder sintético, L-Zm.GSP850.nno:3 (SEQ ID NO:3), que está operativamente ligado 5' a un intrón, I-Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO: 22). Los EXP sintéticos, EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI153.nno:2 (SEQ ID NO:4) y EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI140.nno:1(SEQ ID NO:11) se describen en el Ejemplo 3.

Las células vegetales de variedad de maíz 01DKD2 se transformaron usando el constructo del vector de transformación binaria descrito anteriormente por transformación mediada por *Agrobacterium* como bien se conoce en la técnica. Las células vegetales transformadas resultantes fueron inducidas a formar plantas de maíz enteras. La expresión de GUS cualitativa y cuantitativa se analizó como se describe en el Ejemplo 3. La Tabla 8 muestra los valores de la expresión cuantitativa media de GUS para cada uno de los EXP sintéticos.

Tabla 8. Expresión cuantitativa media de GUS en plantas de maíz de variedad 1DKD2 transformadas en forma estable dirigida por los EXP sintéticos EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.DnaK:1, EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI153.nno:2, y EXP-Zm.GSP850.nno+Zm.GSI140.nno:1.

Etap	Órgano	EXP- Zm.GSP850.nno+Zm. DnaK:1 (SEQ ID NO:15)	EXP- Zm.GSP850.nno+Zm. GSI153.nno:2 (SEQ ID NO:4)	EXP- Zm.GSP850.nno+Z m.GSI140.nno:1 (SEQ ID NO:11)
V4	Hoja	208	374	519
	Raíz	36	606	341
V7	Hoja	314	539	619
	Raíz	22	1158	303
VT	Hoja	26	610	630
	Raíz	32	770	797
	Flor/ant era	104	797	1121
R1	Mazorca /estigma	160	1139	1312
R3	Embrión de	31	188	723

	semilla 21 DAP			
	Endosp ermo de semilla 21 DAP	98	1490	1635

Como se puede observar en la Tabla 8, el promotor y líder sintético GSP850 (P-Zm.GSP850.nno:4 (SEQ ID NO:2) y L-Zm.GSP850.nno:3 (SEQ ID NO:3)) dirigió la expresión constitutiva de GUS en plantas de maíz de variedad LH244 transformadas en forma estable. Los intrones sintéticos, I-Zm.GSI153.nno:1 (SEQ ID NO:5) y I-Zm.GSI140.nno:1 (SEQ ID NO:12) potenciaron la expresión relativa en el intrón, I-Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:22) en todos los tejidos analizados.

Ejemplo 5

Análisis de la expresión de GUS dirigida por los EXP sintéticos EXP-Zm.GSP990.nno+Zm.DnaK:1 y EXP-Zm.GSP990.nno+Zm.GSI197.nno:2 en plantas de maíz de variedad 1DKD2 transformadas en forma estable

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

Las plantas de maíz se transformaron con constructos de expresión de GUS de planta. Los elementos reguladores se clonaron en un vector de expresión de planta base usando métodos estándares conocidos en la técnica. Los vectores de expresión de plantas resultantes contenían una región límite izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens* (límite B-AGRtu.left), un primer casete de selección transgénica utilizado para la selección de células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato; un segundo casete transgénico para evaluar la actividad de los elementos reguladores, que estaba compuesto del EXP sintético EXP-

Zm.GSP990.nno+Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:16) or EXP-Zm.GSP990.nno+Zm.GSI197.nno:2 (SEQ ID NO:9) operativamente ligado 5' a una secuencia codificadora sintética diseñada para la expresión en una célula vegetal que codifica la β -glucuronidasa (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1, SEQ ID NO:20) que contiene un intrón procesable derivado del gen ST-LS1 específico de tejido inducible por luz de papa (Acceso Genbank: X04753), operativamente ligado 5' a una región de terminación 3', T-Sb.Nltp4-1:1:2 (SEQ ID NO:19); y una región límite derecha de *Agrobacterium tumefaciens* (límite B-AGRtu.right). El EXP sintético EXP-Zm.GSP990.nno+Zm.GSI197.nno:2 (SEQ ID NO:9) está compuesto de un promotor sintético, P-Zm.GSP990.nno:2 (SEQ ID NO:7), operativamente ligado 5' a un líder sintético, L-Zm.GSP990.nno:1 (SEQ ID NO:8), que está operativamente ligado 5' a un intrón sintético, I-Zm.GSI197.nno:1 (SEQ ID NO:10). El EXP sintético EXP-Zm.GSP990.nno+Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:16) está compuesto de un promotor sintético, P-Zm.GSP990.nno:2 (SEQ ID NO:7), operativamente ligado 5' a un líder sintético, L-Zm.GSP990.nno:1 (SEQ ID NO:8), que está operativamente ligado 5' a un intrón, I-Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:22).

[01] Las células vegetales de variedad de maíz 01DKD2 se transformaron usando el constructo del vector de transformación binaria descrito anteriormente por transformación mediada por *Agrobacterium* como bien se conoce en la técnica. Las células vegetales transformadas resultantes fueron inducidas a formar plantas de maíz enteras. La expresión de GUS cualitativa y cuantitativa se analizó como se describió previamente en el Ejemplo 3. LÑa Tabla 9 muestra los valores de la expresión cuantitativa media de GUS para cada uno de los EXP sintéticos, donde "ND" indica no determinado.

Tabla 9. Expresión cuantitativa media de GUS en plantas de maíz de variedad 1DKD2 transformadas en forma estable dirigida por los EXP sintéticos EXP-Zm.GSP990.nno+Zm.DnaK:1 y EXP-Zm.GSP990.nno+Zm.GSI197.nno:2.

Etapas	Órgano	EXP-Zm.GSP990.nno+Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:16)	EXP-Zm.GSP990.nno+Zm.GSI197.nno:2 (SEQ ID NO:9)
V4	Hoja	99	75
	Raíz	32	33

V7	Hoja	226	138
	Raíz	29	40
VT	Hoja	140	61
	Raíz	55	96
	Flor/antera	87	231
R1	Mazorca/estigma	39	35
R3	Embrión de semilla 21 DAP	ND	21
	Endospermo de semilla 21 DAP	ND	22

Como se puede ver, el promotor y líder sintético GSP990 (P-Zm.GSP990.nno: 2 (SEQ ID NO: 7) y L-Zm.GSP990.nno: 1 (SEQ ID NO: 8)) dirigieron la expresión de GUS. El análisis molecular del sitio de inicio de la transcripción demostró un TSS consistente para el promotor y líder GSP990. El intrón sintético, I-Zm.GSI197.nno: 1 (SEQ ID NO: 10) atenuó la expresión en algunos tejidos, al tiempo que potencia la expresión en otros tejidos, en relación con el intrón, I-Zm.DnaK: 1 (SEQ ID NO: 22) Por ejemplo, la expresión de GUS se atenuó en la hoja en las etapas V4, V7 y VT. La expresión de GUS se potenció ligeramente en la raíz V7 y VT, en relación con I-Zm.DnaK: 1. La expresión flor/antera se mejoró aproximadamente 2,7 veces por I-Zm.GSI197.nno: 1 (SEQ ID NO: 10), en relación con I-Zm.DnaK: 1. Las diferencias en la expresión impartidas por I-Zm.GSI197.nno: 1 (SEQ ID NO: 10), en relación con I-Zm.DnaK: 1, pueden ser muy útiles cuando se desea una menor expresión de hojas y mayor en flores/anteras. El análisis molecular de los sitios de empalme de intrones demostró un procesamiento consistente del intrón sintético, I-Zm.GSI197.nno: 1 (SEQ ID NO: 10).

Ejemplo 6

Análisis del efecto sobre la expresión de GUS mediante las 3' UTRs sintéticas T-Zm.GST9.nno:2, T-Zm.GST18.nno:2, y T-Zm.GST43.nno:1, y la nativa T-Sb.Ntlp4-1:1:2 en plantas de maíz de variedad 1DKD2 transformadas en forma estable

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

Las plantas de maíz se transformaron con constructos de expresión de GUS de planta. Los elementos reguladores se clonaron en un vector de expresión de planta base usando métodos estándares conocidos en la técnica. Los vectores de expresión de plantas resultantes contenían una región límite izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens* (límite B-AGRtu.left), un primer casete de selección transgénica utilizado para la selección de células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato; un segundo casete transgénico para evaluar la actividad de the 3' UTR elementos reguladores, que estaba compuesto del EXP EXP-CaMV.35S (SEQ ID NO:21), operativamente ligado 5' al intrón, I-Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:22), operativamente ligado 5' a una secuencia codificadora sintética diseñada para la expresión en una célula vegetal que codifica la β -glucuronidasa (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1, SEQ ID NO:20) que contiene un intrón procesable derivado del gen ST-LS1 específico de tejido inducible por luz de papa (Acceso Genbank: X04753), operativamente ligado 5' a una región de terminación 3'; y una región límite derecha de *Agrobacterium tumefaciens* (límite B-AGRtu.right). Tres vectores de expresión de prueba sestaban compuestos de las 3' UTRs T-Zm.GST9.nno:2 (SEQ ID NO:13), T-Zm.GST18.nno:2 (SEQ ID NO:14), o T-Zm.GST43.nno:1 (SEQ ID NO:26) operativamente ligadas a la secuencia codificadora de GUS. Un vector de prueba adicional estaba compuesto de la 3' UTR nativa T-Sb.Nltp4-1:1:2 (SEQ ID NO:19) operativamente ligada a la secuencia codificadora de GUS, y se usó para comparar la expresión entre las 3' UTRs nativas y sintéticas.

Las células vegetales de variedad de maíz 01DKD2 se transformaron usando los constructos de transformación binarios descritos anteriormente por la transformación mediada por *Agrobacterium*, como bien se conoce en la técnica. Las células vegetales transformadas resultantes fueron inducidas a formar plantas de maíz enteras.

El análisis cualitativo y cuantitativo de GUS se usó para evaluar la actividad del elemento de expresión en los tejidos de hojas y raíces V4 de las plantas transformadas

y se realizó como se describió anteriormente en el Ejemplo 3. El efecto de las 3' UTRs sintéticas se evaluó mediante comparación con el efecto de expresión de la 3' UTR T-Sb.Nltp4-1: 1: 2 (SEQ ID NO: 19). Los transcriptos resultantes se analizaron para determinar si se había producido la terminación adecuada y si no se había realizado la ultralectura del transcripto. Un método para evaluar si hubo una ultralectura fue mediante el uso de amplificación de ADNc del transcripto usando un cebador de amplificación correspondiente a una porción de la secuencia límite de T-ADN que es 3' a 3' UTR. La expresión GUS media de plantas transformadas con los cuatro constructos que comprenden T-Zm.GST9.nno: 2 (SEQ ID NO: 13), T-Zm.GST18.nno: 2 (SEQ ID NO: 14), T-Zm. GST43.nno: 1 (SEQ ID NO: 26), y T-Sb.Nltp4-1: 1: 2 (SEQ ID NO: 19) se proporciona en la Tabla 10.

Tabla 10. Expresión cuantitativa media de GUS en plantas de maíz de variedad 1DKD2 transformadas en forma estable de constructos que comprende tres 3' UTRs diferentes.

Eta pa	Órga no	T-Sb.Nltp4- 1:1:2 (SEQ ID NO:19)	T- Zm.GST9.nno:2 (SEQ ID NO:13)	T- Zm.GST18.nno:2 (SEQ ID NO:14)	T- Zm.GST43.nno:1 (SEQ ID NO:26)
V4	Hoja	350	684	423	113
	Raíz	778	924	810	883

Como se puede observar en la Tabla 10, tanto T-Zm.GST9.nno: 2 (SEQ ID NO: 13) como T-Zm.GST18.nno: 2 (SEQ ID NO: 14) potenciaron la expresión de GUS dirigida por EXP-CaMV.35S operablemente ligado a I-Zm.DnaK: 1, en relación con la 3' UTR, T-Sb.Nltp4-1: 1: 2. La expresión de GUS en plantas que comprenden T-Zm.GST9.nno: 2 (SEQ ID NO: 13) fue mayor que las plantas que comprenden T-Zm.GST18.nno: 2. T-Zm.GST43.nno: 1 (SEQ ID NO: 26) potenció la expresión de GUS en la raíz V4 en relación con T-Sb.Nltp4-1: 1: 2, pero atenuó la expresión en la hoja V4. El análisis de los transcriptos GUS de los cuatro constructos demostró la terminación adecuada del transcripto y ninguna evidencia de ultralectura en las transcriptos GUS resultantes. Las 3' UTRs T-Zm.GST9.nno: 2 (SEQ ID NO: 13), T-Zm.GST18.nno: 2 (SEQ ID NO: 14) y T-Zm.GST43.nno: 1 (SEQ ID NO: 26) operan de manera similar a las 3' UTR nativas y demuestran la modulación de la expresión de GUS, en relación

con la T-Sb.Nltp4-1: 1: 2 de 3' UTR nativa. Las cuatro 3' UTR sintéticas y 3' UTR T-Sb.Nltp4-1:1:2 nativo adicional proporcionan un rango de valores de expresión que son útiles para afinar la expresión en plantas de maíz transformadas de manera estable.

Ejemplo 7

Elementos potenciadores derivados de los elementos reguladores

Los potenciadores se derivan de los elementos promotores presentados como SEQ ID NOs: 2 y 7. Los elementos potenciadores pueden estar compuestos por uno o más elementos reguladores *cis* que cuando están operativamente ligado 5' o 3' a un elemento promotor, u operativamente ligado 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están operativamente ligados a un promotor, pueden potenciar o modular los niveles de expresión de una molécula de ADN transcriptible, o proporcionar expresión de una molécula de ADN transcriptible en un tipo de célula u órgano vegetal específico o en un momento particular punto en desarrollo o ritmo circadiano. Los potenciadores se obtienen mediante la eliminación de la caja TATA o elementos funcionalmente similares y cualquier secuencia corriente abajo de los promotores que permiten que se inicie la transcripción de los promotores presentados como las SEQ ID NO: 2 y 7 o fragmentos de los mismos.

La caja TATA en los promotores de plantas no está tan altamente conservada como en algunos otros organismos eucariotas. Por lo tanto, para definir un fragmento como un potenciador, primero se debe identificar el sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen, en el que se transcribe primero la 5' UTR'. Un potenciador derivado del promotor sintético, P-Zm.GSP850.nno: 4 (SEQ ID NO: 2) puede comprender los nucleótidos 1 a 418 de SEQ ID NO: 2, lo que produce el potenciador sintético, E-Zm.GSP850 (SEQ ID NO: 17). Un potenciador derivado del promotor sintético, P-Zm.GSP990.nno: 2 (SEQ ID NO: 7) puede comprender los nucleótidos 1 a 416 de SEQ ID NO: 7, lo que produce el potenciador sintético, E-Zm.GSP990 (SEQ ID NO: 18). Los potenciadores derivados de los promotores pueden comprender fragmentos de SEQ ID NO: 17 y 18, o duplicaciones de SEQ ID NO: 17 y 18 o sus respectivos fragmentos. La efectividad de los potenciadores sintéticos derivados de los promotores sintéticos se determina empíricamente mediante la construcción de un elemento regulador

transcripcional quimérico que comprende fragmentos derivados de los promotores sintéticos P-Zm.GSP850.nno: 4 (SEQ ID NO: 2) o P-Zm. GSP990.nno: 2 (SEQ ID NO: 7), que están operativamente ligados a un promotor y líder y se utiliza para dirigir la expresión de una molécula de ADN transcripible tal como GUS en un ensayo de planta estable o transitorio.

Puede ser necesario un mayor refinamiento 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, ya que el orden de cada elemento dentro del elemento regulador transcripcional quimérico puede impartir diferentes efectos, de acuerdo con las posiciones relativas de cada elemento. Algunos elementos del promotor tendrán múltiples elementos de la caja TATA o caja tipo TATA y potencialmente múltiples sitios de inicio de transcripción. En esas circunstancias, puede ser necesario identificar primero dónde se encuentra el primer TSS y luego comenzar a diseñar potenciadores utilizando el primer TSS para evitar que se inicie potencialmente la transcripción dentro de un supuesto elemento potenciador.

Los elementos potenciadores, derivados de los elementos promotores presentados como SEQ ID NOs: 2 y 7, se clonan usando métodos conocidos en la técnica para estar operativamente ligados 5' o dentro de un elemento promotor, u operativamente ligado 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están operativamente ligados a un promotor. Alternativamente, los elementos potenciadores se pueden clonar, utilizando métodos conocidos en la técnica, para proporcionar un elemento potenciador más grande que esté compuesto por dos o más copias del potenciador y clonar usando métodos conocidos en la técnica para ligarse operativamente 5' o 3' a un elemento promotor, o ligarse operativamente 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están operativamente ligados a un promotor que produce un elemento regulador transcripcional quimérico. Los elementos potenciadores derivados de promotores derivados de genes de organismos de múltiples géneros pueden estar operativamente ligados a los potenciadores derivados de los promotores sintéticos.

Se puede construir un vector de transformación de plantas de expresión GUS usando métodos conocidos en la técnica similares al constructo descrito en el Ejemplo

3 en el que los vectores de expresión de plantas resultantes contienen una región límite izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens* (límite B-AGRtu.left) un primer casete de selección de transgenes utilizado para la selección de células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato; y un segundo casete transgénico para probar el elemento potenciador compuesto por el elemento potenciador operativamente ligado 5' o 3' a un elemento promotor u operativamente ligado 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que a su vez están operativamente ligados a un promotor que está operativamente ligado 5' a un elemento líder, operativamente ligado 5' a un elemento de intrón, operativamente ligado a una secuencia codificadora para β -glucuronidasa (GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1, SEQ ID NO:20) que contiene un intrón procesable derivado del gen ST-LS1 específico de tejido inducible por luz de papa (Acceso Genbank: X04753), operativamente ligado a una región de terminación 3' del gen tipo proteína de transferencia de lípidos de *Oryza sativa* (T-Os.LTP:1, SEQ ID NO:23); y una región límite derecha de *A. tumefaciens* (límite B-AGRtu.right). Los plásmidos resultantes se usan para transformar plantas de maíz u otras plantas de género monocotiledóneas mediante los métodos descritos anteriormente. Alternativamente, las células de protoplastos derivadas del maíz u otras plantas del género monocotiledóneas se transforman utilizando métodos conocidos en la técnica para realizar ensayos transitorios.

La expresión de GUS dirigida por un elemento regulador que comprende uno o más potenciadores se evalúa en ensayos de plantas estables o transitorios para determinar los efectos del elemento potenciador en la expresión de una molécula de ADN transcripible. Las modificaciones a uno o más elementos potenciadores o la duplicación de uno o más elementos potenciadores se pueden realizar sobre la base de experimentación empírica y la regulación de la expresión génica resultante que se observa usando cada composición de elementos reguladores. La alteración de las posiciones relativas de uno o más potenciadores en los elementos reguladores o quiméricos resultantes puede afectar la actividad transcripcional o la especificidad del elemento regulador o quimérico y se determina empíricamente para identificar los mejores potenciadores para el perfil de expresión transgénico deseado dentro de la planta de maíz. u otra planta de género.

PATENTE

MONS:464US

Habiendo ilustrado y descrito los principios de la invención, debería ser evidente para las personas versadas en el arte que la invención se puede modificar en cuanto a su disposición y detalle sin alejarse de dichos principios. Reivindicamos todas las modificaciones que se encuentran dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones. Todas las publicaciones y documentos patente publicados que se citan en la presente se incorporan por referencia al mismo punto que si se hubiera específica e individualmente indicado que cada publicación individual o solicitud de patente individual se incorpora por referencia.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada entre el grupo que consiste en:

- a) una secuencia con al menos 85% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOS:1-19 y SEQ ID NO:26;
- b) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NOS:1-19 y SEQ ID NO:26; y
- c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOS:1-19 y SEQ ID NO:26, en donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes;

en donde dicha secuencia de ADN está operativamente ligada a una molécula de ADN transcribable heteróloga.

2. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia comprende al menos 90% de identidad de secuencia respecto de la secuencia de ADN de cualquiera de SEQ ID NOS:1-19 y SEQ ID NO:26.

3. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia comprende al menos 95% de identidad de secuencia respecto de la secuencia de ADN de cualquiera de SEQ ID NOS:1-19 y SEQ ID NO:26.

4. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde la secuencia de ADN comprende actividad reguladora génica.

5. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde la molécula de ADN transcribable heteróloga comprende un gen de interés agrónomo.

6. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 5, en donde el gen de interés agrónomo confiere tolerancia a herbicida en plantas.

7. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 5, en donde el gen de interés agrónomo confiere resistencia a plagas en plantas.

8. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que la molécula de ADN transcripible heteróloga codifica un ARNsd, un ARNmi o un ARNsi.

9. Una célula vegetal transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada entre el grupo que consiste en:

- a) una secuencia con al menos 85% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOS:1-19 y SEQ ID NO:26;
- b) una secuencia de ADN que comprende cualquiera de SEQ ID NOS:1-19 y SEQ ID NO:26; y
- c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOS:1-19 y SEQ ID NO:26, en donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes;

en donde dicha secuencia de ADN está operativamente ligada a una molécula de ADN transcripible heteróloga.

10. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 9, en donde dicha célula vegetal transgénica es una célula de planta monocotiledónea.

11. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 9, en donde dicha célula vegetal transgénica es una célula de planta dicotiledónea.

12. Una planta transgénica, o parte de la misma, que comprende una molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

13. Una planta de progenie de la planta transgénica de la reivindicación 12 o parte de la misma, en donde la planta de progenie comprende dicha molécula de ADN recombinante.

14. Una semilla transgénica, en donde la semilla comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.

15. Un método de producir un producto básico que comprende obtener una planta transgénica o parte de la misma de acuerdo con la reivindicación 12 y producir el producto básico a partir de la misma.

16. El método de la reivindicación 15, el donde el producto básico son semillas, semillas procesadas, concentrado de proteínas, aislado de proteínas, almidón, granos, partes de plantas, aceite de semillas, biomasa, harina o sémola.

17. Un método para expresar una molécula de ADN transcriptible que comprende obtener una planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 12, y cultivar la planta, en donde el ADN transcriptible es expresado.

RESUMEN

La invención provee construcciones y moléculas de ADN recombinante, así como sus secuencias de nucleótidos útiles para modular la expresión génica en plantas. La invención también provee plantas, células vegetales, partes de las plantas, semillas y plantas de progenies transgénicas que comprenden las moléculas de ADN recombinante operativamente ligadas a moléculas de ADN transcribibles heterólogas, junto con sus métodos de uso.