

ELEMENTOS REGULADORES DE PLANTAS Y USOS DE LOS MISMOS

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[01] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos Nro. 62/790.570, presentada el 10 de enero de 2019, que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DE LISTADO DE SECUENCIAS

[02] El listado de secuencias del archivo denominado “MONS468US_ST25.txt” tiene 33.896 bytes (medidos en Microsoft Windows®), fue creado el 9 de enero de 2020, y se presenta aquí por envío electrónico y se incorpora a la presente por referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[03] La invención se refiere al campo de la biología molecular de plantas y la ingeniería genética de plantas. Más específicamente, la invención se refiere a moléculas de ADN útiles para modular la expresión génica en plantas.

ANTECEDENTES

[04] Los elementos reguladores son elementos genéticos que regulan la actividad génica modulando la transcripción de una molécula de ADN transcribible operativamente unida. Dichos elementos pueden incluir promotores, líderes, intrones y regiones no traducidas 3', y son útiles en el campo de la biología molecular de plantas y la ingeniería genética de plantas.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

[05] La invención proporciona nuevos elementos reguladores de genes para su uso en plantas. La invención también proporciona constructos de moléculas de ADN recombinante que comprenden los 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 unidos a una molécula de

ADN transcribible. En ciertas formas de realización, la molécula de ADN transcribible puede ser heteróloga con respecto a la secuencia reguladora. Por lo tanto, una secuencia de elemento regulador proporcionada por la invención puede, en formas de realización particulares, definirse como unida operativamente a una molécula de ADN transcribible heteróloga. La presente invención también proporciona métodos para usar los elementos reguladores y hacer 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 unidos operativamente a una molécula de ADN transcribible.

[06] Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOS: 2–8, 12–14 y 16–19; (b) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NOS: 2–8, 12–14 y 16–19; y (c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOS: 2–8, 12–14 y 16–19, en donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; en donde la secuencia está operativamente unida a una molécula de ADN transcribible heteróloga. Por “molécula de ADN transcribible heteróloga” se entiende que la molécula de ADN transcribible es heteróloga con respecto a la secuencia de polinucleótidos a la que está operativamente unida. En formas de realización específicas, la molécula de ADN recombinante comprende una secuencia de ADN que tiene 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 SEQ ID NOS: 2–8, 12–14 y 16–19. En formas de realización particulares, la secuencia de ADN comprende un elemento regulador. En algunas formas de realización, el elemento regulador comprende un promotor unido operativamente a un intrón. En otras formas de realización más, el elemento regulador comprende una UTR 3'. En todavía otras formas de realización, la molécula de ADN transcribible heteróloga comprende un gen de interés agronómico, tal como un gen capaz de proporcionar resistencia a los herbicidas en las plantas, o un gen capaz de proporcionar resistencia a las plagas de plantas en las plantas. En incluso otras formas de realización, la molécula de ADN transcribible heteróloga comprende una secuencia que codifica un ARN

pequeño, tal como un dsRNA, un miRNA o un siRNA. En otras formas de realización más, la invención proporciona un constructo que comprende una molécula de ADN recombinante como se proporciona en este documento.

[07] En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan células vegetales transgénicas que comprenden una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOs: 2-8, 12-14 y 16-19; (b) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NOs: 2-8, 12-14 y 16-19; y (c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOs: 2-8, 12-14 y 16-19, en donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; en donde la secuencia de ADN está operativamente unida a una molécula de ADN transcribible heteróloga. En ciertas formas de realización, la célula vegetal transgénica es una célula vegetal monocotiledónea. En otras formas de realización, la célula vegetal transgénica es una célula vegetal monocotiledónea o una célula vegetal dicotiledónea.

[08] En otro aspecto más, se proporciona además en el presente documento una planta transgénica, o una parte de la misma, que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en: a) una secuencia con al menos 85% de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 2-8, 12-14 y 16-19; b) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NOs: 2-8, 12-14 y 16-19; y c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOs: 2-8, 12-14 y 16-19, en donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; en donde la secuencia está operativamente unida a una molécula de ADN transcribible heteróloga. En formas de realización específicas, la planta transgénica es una planta de progenie de cualquier generación que comprende la molécula de ADN recombinante. En el presente documento también se proporciona una semilla transgénica que comprende la molécula de ADN recombinante que produce dicha planta transgénica cuando se cultiva.

[09] En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un producto básico, que comprende obtener una planta transgénica o una 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 y harina.

[10] En otro aspecto más, la invención proporciona un método para producir una planta transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante de la invención, que comprende transformar una célula vegetal con la molécula de ADN recombinante de la invención para producir una célula vegetal transformada y regenerar una planta transgénica a partir de la célula vegetal transformada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

[11] SEQ ID NO: 1 es una secuencia de ADN del 3' UTR, T-SETit.Ams1:1, derivada del gen de la proteína S-adenosilmetionina sintetasa 1 de *Setaria italica* (mijo de cola de zorra).

[12] SEQ ID NO: 2 es una secuencia de ADN del 3' UTR, T-Cl.Hsp16.9_2:1, derivada del gen de la proteína Hsp16.9 (proteína de choque térmico 16.9) de *Coix lacryma-jobi* (lágrimas de Jacobo).

[13] SEQ ID NO: 3 es una secuencia de ADN del 3' UTR, T-ERIr.Hsp17.9_3:1, derivada de un gen putativo de proteína de choque térmico de *Eragrostis tef* (Tef).

[14] SEQ ID NO: 4 es una secuencia de ADN del 3' UTR, T-ERIr.Hsp16.9_3:1, derivado del gen de la proteína Hsp16.9 (proteína de choque térmico 16.9) de *Saccharum ravennae* (hierba de pampa resistente).

[15] SEQ ID NO: 5 es una secuencia de ADN del 3' UTR, T-ANDge.Hsp/Sb.Hsp, una 3' UTR quimérica derivada de genes de proteína de choque térmico de *Andropogon gerardii* (andropogón grande) y *Sorghum bicolor* (sorgo).

[16] SEQ ID NO: 6 es una secuencia de ADN de un EXP, EXP-Zm.LTP-SETit.Act4 que comprende un promotor y 5' UTR derivado de un gen de proteína similar a la proteína de transferencia de lípidos de *Zea mays*, unido operativamente 5' a un intrón derivado de un gen de actina 4 de *Setaria italica*.

[17] SEQ ID NO: 7 es una secuencia de ADN de un promotor, P-Zm.Ltp-1:1:2, derivado de una proteína similar a la proteína de transferencia de lípidos de *Zea mays*.

[18] SEQ ID NO: 8 es una secuencia de ADN de una 5' UTR (líder), L-Zm.Ltp-1:1:3, derivado de una proteína similar a la proteína de transferencia de lípidos de *Zea mays*.

[19] SEQ ID NO: 9 es una secuencia de ADN de un intrón, I-SETit.Act4:2, derivado de un gen de actina 4 de *Setaria italica*.

[20] SEQ ID NO: 10 es una secuencia de ADN de un potenciador, E–CaMV.35S–RC derivado del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor en una orientación complementaria inversa.

[21] SEQ ID NO: 11 es una secuencia de codificación sintética optimizada para la expresión vegetal para β –glucuronidasa (GUS) con un intrón procesable derivado del gen ST–LS1 específico de tejido inducible por luz de papa (Acceso a GenBank: X04753).

[22] SEQ ID NO: 12 es una secuencia de ADN del 3' UTR, T–Cl.Hsp16.9:2, derivado del gen de la proteína Hsp16.9 (proteína de choque térmico 16.9) de *Saccharum ravennae* (hierba de pampa resistente).

[23] SEQ ID NO: 13 es una secuencia de ADN del 3' UTR, T–Cl.Hsp16.9:2, derivado del gen de la proteína Hsp16.9 (proteína de choque térmico 16.9) de *Coix lacryma–jobi* (lágrimas de Jacobo).

[24] SEQ ID NO: 14 es una secuencia de ADN de un potenciador reagrupado quimérico, E–DaMV.H–Flt:1, derivado de múltiples promotores públicos del virus del mosaico de Dalia. Un primer fragmento se deriva del promotor de la cepa DaMV–Holland (DaMV–H), acceso Genbank EU090957, nucleótidos 1177–1494. Este fragmento está operativamente unido a un segundo fragmento derivado del promotor DaMV–H, nucleótidos 1003–1176. En la configuración del promotor DaMV nativo, el segundo fragmento precedería al primer fragmento. Dentro del primer fragmento, los nucleótidos 287 a 288 y los nucleótidos 319 a 322 se cambiaron a secuencias en ubicaciones análogas de un promotor DaMV dentro del acceso Genbank JX272320.

[25] SEQ ID NO: 15 es una secuencia de ADN de un potenciador, E–DaMV.FLT:2, derivado de un promotor del virus del mosaico de Dalia, acceso Genbank EF513491, nucleótidos 1 a 322.

[26] SEQ ID NO: 16 es una secuencia de ADN de un EXP, EXP–DaMV.H–Flt+Zm.Ltp+SETit.Act4:1 compuesto por el potenciador reagrupado quimérico, E–DaMV.H–Flt:1 (SEQ ID NO: 14), enlazado operativamente 5' al promotor y 5' UTR derivado de un gen de proteína similar a la proteína de transferencia de lípidos de *Zea mays*, operativamente unido 5' a un intrón derivado de un gen de actina 4 de *Setaria italica*.

[27] SEQ ID NO: 17 es una secuencia de ADN de un EXP, EXP–DaMV.H–Flt+Zm.Ltp+SETit.Act4:1 compuesto por el potenciador reagrupado quimérico, E–DaMV.H–

Flt:1 (SEQ ID NO: 14), operativamente unido 5' al promotor y 5' UTR derivado de un gen de proteína similar a la proteína de transferencia de lípidos de *Zea mays*, operativamente unido 5' a un intrón derivado de un gen de actina 4 de *Setaria italica*. El potenciador reagrupado quimérico E–DaMV.H–Flt:1 se clona en la orientación opuesta con respecto a EXP–DaMV.H–Flt+Zm.Ltp+SETit.Act4:1 (SEQ ID NO: 16).

[28] SEQ ID NO: 18 es una secuencia de ADN de un EXP, EXP–DaMV.FLT+Td.RCc3_1+SETit.14–3–3C–5:1 compuesto por el potenciador, E–DaMV.FLT:2 operativamente unido 5' al promotor y 5' UTR derivado de un gen RCc3 de *Trypsicum dactyloides*, operativamente unido 5' a un intrón derivado de un gen 14–3–3C de *Setaria italica*.

[29] SEQ ID NO: 19 es una secuencia de ADN de un EXP, EXP–DaMV.FLT+Td.RCc3_1+SETit.14–3–3C–5:1 compuesto por el potenciador, E–DaMV.FLT:2 operativamente unido 5' al promotor y 5' UTR derivado de un gen RCc3 de *Trypsicum dactyloides*, operativamente unido 5' a un intrón derivado de un gen 14–3–3C de *Setaria italica*. El potenciador E–DaMV.FLT:2 se clona en la orientación opuesta con respecto a EXP–DaMV.FLT+Td.RCc3_1+SETit.14–3–3C–5:1 (SEQ ID NO: 18).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[30] La invención proporciona elementos reguladores que tienen actividad reguladora de genes en plantas. Las secuencias de nucleótidos de estos elementos reguladores se proporcionan como SEQ ID NOS: 2–8, 12–14 y 16–19. Estos elementos reguladores pueden afectar la expresión de una molécula de ADN transcribible operativamente unida en tejidos vegetales y, por lo tanto, regular la expresión génica de un transgén operativamente unido en plantas transgénicas. La invención también proporciona métodos para modificar, producir y usar moléculas de ADN recombinante que contienen los elementos reguladores proporcionados. La invención también proporciona composiciones que incluyen células vegetales, plantas, partes de plantas y semillas transgénicas que contienen las moléculas de ADN recombinante de la invención, y métodos para prepararlas y usarlas.

[31] Las siguientes definiciones y métodos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos en la materia en la práctica de la presente invención. A

menos que se indique lo contrario, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por parte de los expertos en la técnica relevante.

Moléculas de ADN

[32] Tal como se usa en el presente documento, el término "ADN" o "molécula de ADN" se refiere a una molécula de ADN bicatenario de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases de desoxirribonucleótidos o una molécula de ADN, leída del extremo 5' (corriente arriba) al extremo 3' (corriente abajo). Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencia de ADN" se refiere a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN. La nomenclatura utilizada en este documento corresponde a la del Título 37 del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos § 1.822, y se establece en las tablas de la Norma ST.25 (1998) de la OMPI, Apéndice 2, Tablas 1 y 3.

[33] Tal como se usa en el presente documento, una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que comprende una combinación de moléculas de ADN que no se producirían juntas de forma natural sin la intervención humana. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante puede ser una molécula de ADN que está compuesta por al menos dos moléculas de ADN heterólogas entre sí, una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que se desvía de las secuencias de ADN que existen en la naturaleza, una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN sintético o una molécula de ADN que se ha incorporado al ADN de una célula huésped mediante transformación genética o edición de genes.

[34] La referencia en esta solicitud a una "molécula de ADN aislada", o un término o frase equivalente, significa que la molécula de ADN está presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no dentro de su entorno natural. Por ejemplo, los elementos de ácido nucleico como una secuencia codificante, 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 y cuando el elemento esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en la que se encuentra naturalmente. Sin embargo, cada uno de estos elementos, y las subpartes de estos elementos, estarían "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 la 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 consideraría aislada a los fines de esta divulgación. A los fines de esta divulgación, cualquier secuencia de nucleótidos transgénica, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en el genoma de las células de una planta o bacteria, o presente en un vector extracromosómico, se consideraría una secuencia de nucleótidos aislada si está presente dentro del plásmido o una 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 básicos derivados de la planta o bacteria.

[35] Tal como se usa en el presente documento, el término "identidad de secuencia" se refiere al grado en que dos secuencias de polinucleótidos óptimamente alineadas o dos secuencias de polipéptidos óptimamente alineadas son idénticas. Se crea una alineación de secuencias óptima alineando manualmente dos secuencias, por ejemplo, una secuencia de referencia y otra secuencia, para maximizar el número de coincidencias de nucleótidos en la alineación de secuencias con inserciones, deleciones o huecos de nucleótidos internos apropiados. Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia de ADN proporcionada como SEQ ID NOs: 2–8, 12–14 y 16–19.

[36] Tal como se usa en el presente documento, el término "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje de identidad" o "% de identidad" es la fracción de identidad multiplicada por 100. La "fracción de identidad" para una secuencia óptimamente alineada con una secuencia de referencia es el número de nucleótidos coincidentes en la alineación óptima, dividido por el número total de nucleótidos en la secuencia de referencia, por ejemplo, el número total de nucleótidos en la longitud completa de toda la secuencia de referencia. Por lo tanto, una forma de realización de la invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia que, cuando se alinea óptimamente con una secuencia de referencia, proporcionada aquí como SEQ ID NOs: 2–8, 12–14 y 16–19, tiene al menos aproximadamente 85% 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 porcentaje de identidad de secuencia con la molécula de referencia pueden exhibir la actividad de la secuencia de referencia.

Elementos reguladores

[37] Los elementos reguladores como promotores, líderes (también conocidos como 5' UTR), potenciadores, intrones y regiones de terminación de la transcripción (o 3' UTR) juegan un papel integral en la expresión general de los genes en las células vivas. El término "elemento regulador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ADN que tiene actividad reguladora de genes. El término "actividad reguladora de genes", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de afectar la expresión de una molécula de ADN transcribible operativamente unida, por ejemplo afectando la transcripción y/o la traducción de la molécula de ADN transcribible operativamente unida. Los elementos reguladores, como promotores, líderes, potenciadores, intrones y 3' UTR que funcionan en las plantas, son útiles para modificar los fenotipos de las plantas mediante la ingeniería genética.

[38] Tal como se usa en este documento, una secuencia de “ grupo de elementos de expresión reguladores” o “EXP” puede referirse a un grupo de elementos reguladores operativamente unidos, tales como potenciadores, promotores, líderes e intrones. Por ejemplo, un grupo de elementos de expresión reguladores puede estar compuesto, por ejemplo, de un promotor operativamente unido 5' a una secuencia líder, operativamente unido 5' a una secuencia de intrón. Un EXP útil en la práctica de la presente invención se presenta como SEQ ID NOs: 6, 16, 17, 18 y 19.

[39] Los elementos reguladores pueden caracterizarse por su patrón de expresión génica, por ejemplo, efectos positivos y/o negativos tales como la expresión constitutiva o expresión temporal, espacial, de desarrollo, tisular, ambiental, fisiológica, patológica, del ciclo celular y/o químicamente sensible, y cualquier combinación de las mismas, así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas. Tal como se usa en el presente documento, un "patrón de expresión

génica" es cualquier patrón de transcripción de una molécula de ADN operativamente unida en una molécula de ARN transcrita. La molécula de ARN transcrita puede traducirse para producir una molécula de proteína o puede proporcionar una molécula de ARN antisentido u otra molécula reguladora de ARN, como un ARN bicatenario (dsRNA), un ARN de transferencia (tRNA), un ARN ribosómico (rRNA), un microARN (miRNA), un ARN interferente pequeño (siRNA) y similares.

[40] Tal como se usa en el presente documento, 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 caracterizarse por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo o morfológicas, así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas.

[41] Un promotor es útil como elemento regulador para modular la expresión de una molécula de ADN transcribible operativamente unida. Tal como se utiliza aquí, el término "promotor" se refiere generalmente a una molécula de ADN que está implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa II y otras proteínas, tales como factores de transcripción transactuantes, para iniciar la transcripción. Un promotor puede aislarse inicialmente de la región 5' no traducida (5' UTR) de una copia genómica de un gen. Alternativamente, 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 heterólogo. Un promotor útil en la práctica de la presente invención se proporciona como SEQ ID NO: 7, o el promotor comprendido dentro de SEQ ID NO: 18, o un fragmento o variante del mismo. En formas de realización específicas de la invención, las moléculas de ADN reivindicadas y cualquier variante o derivado de las mismas como se describe en el presente documento, se definen adicionalmente por comprender actividad promotora, es decir, son capaces de actuar como promotor en una célula huésped, tal como en una planta transgénica. En otras formas de realización específicas adicionales, un fragmento puede definirse por exhibir actividad promotora poseída por la molécula promotora inicial de la cual deriva, o un fragmento puede comprender un "promotor mínimo" que proporciona un nivel basal de transcripción y está compuesto por una caja TATA o secuencia de ADN equivalente para el reconocimiento y la unión del complejo de ARN polimerasa II para el inicio de la transcripción.

[42] En una forma de realización, se proporcionan fragmentos de una secuencia de EXP o una secuencia promotora divulgada aquí. Los fragmentos promotores pueden comprender actividad promotora, como se describió anteriormente, y pueden ser útiles solos o en combinación con otros promotores y fragmentos promotores, como en la construcción de promotores quiméricos, o en combinación con otros elementos de expresión y fragmentos de elementos de expresión. En formas de realización específicas, se proporcionan 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 350, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 450, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 550, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 650, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 750, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 1100, al menos aproximadamente 1200, al menos aproximadamente 1300, al menos aproximadamente 1400, al menos aproximadamente 1500, al menos aproximadamente 1600, al menos aproximadamente 1700, al menos aproximadamente 1800, al menos aproximadamente 1900 o al menos aproximadamente 2000 nucleótidos contiguos, o más largos, de una molécula de ADN que tiene actividad promotora como se describe en este documento. Los métodos para producir tales fragmentos a partir de una molécula promotora inicial son bien conocidos en la técnica.

[43] Las composiciones derivadas del promotor proporcionado en la SEQ ID NO: 7, o el promotor comprendido en la SEQ ID NO: 18, como las delecciones internas o 5', por ejemplo, pueden producirse utilizando métodos conocidos en la técnica para mejorar o alterar la expresión, que incluyen eliminar elementos que tienen efectos positivos o negativos en la expresión; duplicar elementos que tienen efectos positivos o negativos en la expresión; y/o duplicar o eliminar elementos que tienen efectos específicos de tejido o célula en la expresión. Las composiciones derivadas del promotor proporcionado en SEQ ID NO: 7, o el promotor comprendido dentro de SEQ ID NO: 18, compuestas de delecciones 3' en las que se elimina el elemento de caja TATA o una secuencia equivalente del mismo y la secuencia corriente abajo se pueden usar, por ejemplo, para hacer elementos potenciadores. Se pueden

hacer más eliminaciones para quitar cualquier elemento que tenga efectos positivos o negativos; específicos de tejido; específicos de célula; o específicos de tiempo (como, entre otros, el ritmo circadiano) en la expresión. El elemento promotor proporcionado en SEQ ID NO: 7 o el promotor comprendido dentro de SEQ ID NO: 18, y los fragmentos o potenciadores derivados de los mismos, se pueden usar para hacer composiciones de elementos reguladores quiméricos de la transcripción.

[44] De acuerdo con la invención, un promotor o fragmento de promotor puede analizarse para detectar la presencia de elementos promotores conocidos, es decir, características de secuencia de ADN, tales como una caja TATA y otros motivos conocidos del sitio de unión del factor de transcripción. La identificación de dichos elementos promotores conocidos puede ser utilizada por el experto en la técnica para diseñar variantes del promotor que tengan un patrón de expresión similar al promotor original.

[45] Tal como se usa en el presente documento, el término "líder" se refiere a una molécula de ADN aislada del gen de la región 5' no traducida (5' UTR), y se define generalmente como un segmento de nucleótidos entre el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y el sitio de inicio de la secuencia codificante de proteína. Alternativamente, los líderes pueden ser elementos de ADN producidos o manipulados sintéticamente. Un líder puede usarse como un elemento regulador 5' para modular la expresión de una molécula de ADN transcribible operativamente unida. Las moléculas líderes pueden usarse con un promotor heterólogo o con su promotor nativo. Un líder útil en la práctica de la presente invención se proporciona como SEQ ID NO: 8 y el líder comprendido dentro de SEQ ID NO: 18. En formas de realización específicas, tales secuencias de ADN pueden definirse como capaces de actuar como líder en una célula huésped, que incluye, por ejemplo, una célula vegetal transgénica. En una forma de realización, tales secuencias se decodifican como con actividad de líder.

[46] Las secuencias líder (también denominadas 5' UTR) presentadas como SEQ ID NO: 8, o el líder comprendido dentro de SEQ ID NO: 18, pueden estar formados por elementos reguladores o pueden adoptar estructuras secundarias que pueden tener un efecto sobre la transcripción o traducción de una molécula de ADN transcribible operativamente unida. Las secuencias líderes presentadas como SEQ ID NO: 8, o el líder comprendido dentro de SEQ ID NO: 18, se pueden usar de acuerdo con la invención para hacer elementos reguladores

quiméricos que afecten la transcripción o traducción de una molécula de ADN transcribible operativamente unida.

[47] Tal como se usa en el presente documento, el término "intrón" se refiere a una molécula de ADN que puede aislarse o identificarse a partir de un gen y puede definirse generalmente como una región escindida durante el procesamiento del ARN mensajero (mRNA) antes de la traducción. Alternativamente, un intrón puede ser un elemento de ADN producido o manipulado sintéticamente. Un intrón puede contener elementos potenciadores que efectúan la transcripción de genes unidos operativamente. Se puede usar un intrón como elemento regulador para modular la expresión de una molécula de ADN transcribible operativamente unida. Un constructo puede comprender un intrón, y el intrón puede ser heterólogo o no con respecto a la molécula de ADN transcribible. Los ejemplos de intrones en la técnica incluyen el intrón de actina del arroz y el intrón HSP70 del maíz.

[48] En las plantas, la inclusión de algunos intrones en los constructos de genes conduce a un aumento de la acumulación de ARNm y proteínas en relación con los constructos que carecen del intrón. Este efecto se ha denominado "mejora mediada por intrones" (IME) de la expresión génica. Se han identificado intrones que se sabe que estimulan la expresión en plantas en genes de maíz (por ejemplo, tubA1, Adh1, Sh1 y Ubi1), en genes de arroz (por ejemplo, tpi) y en genes de plantas dicotiledóneas como los de petunia (por ejemplo, rbcS), papa (por ejemplo, st-ls1) y *Arabidopsis thaliana* (por ejemplo, ubq3 y pat1). Se ha demostrado que las delecciones o mutaciones dentro de los sitios de empalme de un intrón reducen la expresión génica, lo que indica que podría ser necesario un empalme para la IME. Sin embargo, se ha demostrado IME en plantas dicotiledóneas 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 una colección de elementos de control básicos para la construcción de elementos de ADN recombinante apropiados. Los ejemplos de intrones útiles en la práctica de la presente invención se presentan como SEQ ID NOs: 9 y el líder comprendido dentro de SEQ ID NO: 18.

[49] En una forma de realización, se proporcionan fragmentos de una secuencia de intrones divulgada aquí. Los fragmentos de intrón pueden comprender actividad intrónica, como se describió anteriormente, y pueden ser útiles solos o en combinación con otros elementos de expresión y fragmentos de elementos de expresión. En formas de realización específicas, se

proporcionan fragmentos de un 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 350, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 450, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 550, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 650, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 750, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 1100, al menos aproximadamente 1200, al menos aproximadamente 1300, al menos aproximadamente 1400, al menos aproximadamente 1500, al menos aproximadamente 1600, al menos aproximadamente 1700, al menos aproximadamente 1800, al menos aproximadamente 1900 o al menos aproximadamente 2000 nucleótidos contiguos, o más, de una molécula de ADN que tiene actividad intrónica como se describe en este documento. Los métodos para producir tales fragmentos a partir de una molécula de intrón inicial son bien conocidos en la técnica.

[50] Tal como se usa en este documento, los términos "molécula de terminación de la transcripción 3'", "región no traducida 3'" o "UTR 3'" 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 ARNm. La región no traducida 3' de una molécula de ARNm puede generarse mediante escisión específica y poliadenilación 3', también conocida como cola poliA. Una 3' UTR puede estar operativamente unida y ubicada corriente abajo de una molécula de ADN transcribible y puede incluir una señal de poliadenilación y otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción, el procesamiento de ARNm o la expresión génica. Se cree que las colas poliA funcionan en la estabilidad del ARNm y en el inicio de la traducción. Los ejemplos de moléculas de terminación de la transcripción 3' en la técnica son la región 3' de nopalina sintasa, la región 3' de hsp17 de trigo, la región 3' de la subunidad pequeña de guisante rubisco, la región 3' de E6 de algodón y la 3' UTR de coixina.

[51] Las 3' UTR generalmente encuentran un uso beneficioso para la expresión recombinante de moléculas de ADN específicas. Una 3' UTR débil tiene el potencial de generar lectura, 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 la lectura en secuencias de ADN (por ejemplo, otros casetes de expresión) localizados corriente abajo y puede además permitir un reciclaje eficiente de la ARN polimerasa para mejorar la expresión génica. La terminación eficiente de la transcripción (liberación de ARN polimerasa II del ADN) es un requisito previo para reiniciar la transcripción y, por lo tanto, afecta directamente el nivel general de transcripción. Después de la terminación de la transcripción, el ARNm maduro se libera del sitio de síntesis y la plantilla se transporta al citoplasma. Los ARNm eucariotas se acumulan como formas poli(A) *in vivo*, lo que dificulta la detección de sitios de terminación de la transcripción por métodos convencionales.

[52] La regulación de la función génica a través de 3' UTR es un campo relativamente nuevo ya que solo la tecnología de secuenciación reciente nos ha proporcionado el panorama completo de 3' UTR entre distintas especies y tipos de células. Antes de que la tecnología de secuenciación estuviera disponible, se realizaban estudios funcionales y mecánicos detallados solo en unas pocas 3' UTR modelo. Aunque estas 3' UTR modelo han contribuido sustancialmente a nuestra comprensión de la biología de 3' UTR, las conclusiones extraídas sobre sus funciones reguladoras han sido limitadas y se centraron más en la estabilidad del ARNm (Mayr, Christine (2017) *Regulation by 3'-Untranslated Regions*. Annual Review of Genetics, 51: 171–194). Un análisis *in silico* de todo el genoma reveló que los motivos en la 3' UTR se conservan principalmente en una cadena, lo que es consistente con la 3' UTR que actúa para regular la expresión génica a nivel post-transcripcional (Xie, X. et. al., (2005) *Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals*, Nature 434: 338–345). Las 3' UTR determinan los niveles de proteínas a través de la regulación de la estabilidad del ARNm y la traducción mediada en gran medida por elementos ricos en AU y miRNA. Las 3' UTR también permiten la traducción local a través de la regulación de la localización del ARNm. La longitud de una 3' UTR puede regularse mediante escisión alternativa y poliadenilación. Las 3' UTR median las interacciones proteína–proteína (PPI), lo que tiene consecuencias generalizadas para la formación de complejos de proteínas, la localización de proteínas y la función de proteínas. Las 3' UTR regulan la expresión génica a través de la unión de proteínas de unión a ARN (RBP). Las RBP se unen a los elementos *cis* de 3' UTR y median las funciones de 3' UTR a través del reclutamiento de proteínas efectoras. Las RBP cooperan con otras RBP unidas para permitir la especificidad funcional *in vivo*. La

composición de las RBP unidas a una 3' UTR en un momento dado es dinámica y puede cambiar según el entorno local, por ejemplo, mediante la adición de modificaciones postraduccionales, la expresión local de otras RBP, e interacciones con membranas y filamentos citoesqueléticos. La unión de RBP también está influenciada por la formación de estructuras de ARN secundarias y terciarias que regulan la accesibilidad de las 3' UTR (Mayr, Christine (2017) *Regulation by 3'-Untranslated Regions*. Annual Review of Genetics, 51: 171–194).

[53] La cola poli(A) resulta de la adición de una serie de bases de adenosina al extremo 3' de una molécula de ARN. Esto proporciona al ARNm un sitio de unión para una clase de factores reguladores llamados proteínas de unión a poli(A) (PABP) que tienen funciones en la regulación de la expresión génica, incluida la exportación de ARNm, la estabilidad y descomposición, y la traducción. La estructura de cierre 5' del ARNm y la cola poli-A funcionan sinérgicamente para controlar la traducción del ARNm. La asociación de PABP con la cola poli(A) facilita una interacción con eIF4F unido a la estructura de cierre 5', lo que causa la circularización del ARNm que promueve la iniciación de la traducción y garantiza el reciclaje de ribosoma y la traducción eficaz. Esta interacción también permite la inhibición de la traducción por proteínas inhibitoras unidas a la 3' UTR (Barret, L et. al. (2012) *Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated regions and other non-coding elements*. Cell. Mol. Life Sci. 69:3613–3634).

[54] Desde un punto de vista práctico, generalmente es beneficioso que una 3' UTR utilizada en un casete de expresión posea las siguientes características. En primer lugar, la 3' UTR debería ser capaz de terminar de manera eficiente y efectiva la transcripción del transgén y evitar la lectura del transcripto en cualquier secuencia de ADN vecina, que puede estar compuesta por otro casete de expresión como en el caso de los casetes de expresión múltiple que residen en un ADN de transferencia (T-DNA), o el ADN cromosómico vecino en el que se ha insertado el T-DNA. En segundo lugar, la 3' UTR no debería causar una reducción en la actividad transcripcional impartida por el promotor, líder, potenciadores e intrones que se utilizan para impulsar la expresión de la molécula de ADN, a menos que este sea un resultado deseado. En los ejemplos siguientes se proporcionan datos que muestran que, usando las mismas secuencias de potenciador, promotor, líder e intrón para impulsar la expresión, las 3' UTR presentadas como SEQ ID NOs: 1–5 modulan la expresión de manera diferente una de la otra y demuestran efectos específicos de tejido en la expresión de proteínas. Finalmente, en la biotecnología vegetal, la 3' UTR se usa a menudo para cebar reacciones de amplificación de ARN transcrito inverso extraído

de la planta transformada y se usa para: (1) evaluar la actividad transcripcional o la expresión del casete de expresión una vez integrado en el cromosoma de la planta; (2) evaluar el número de copias de inserciones dentro del ADN de la planta; y (3) evaluar la cigosidad de la semilla resultante después de la reproducción. La 3' UTR también se usa en reacciones de amplificación de ADN extraído de la planta transformada para caracterizar la integridad del casete insertado. Las 3' UTR útiles en la práctica de la presente invención se presentan como SEQ ID NOs: 1–5 y 12–13.

[55] En una forma de realización, se proporcionan fragmentos de una secuencia 3' UTR descrita en el presente documento. Los fragmentos de 3' UTR pueden comprender actividad de 3' UTR, como se describió anteriormente, y pueden ser útiles solos o en combinación con otros elementos de expresión y fragmentos de elementos de expresión. En formas de realización específicas, se proporcionan fragmentos de una 3' UTR 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 350, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 450, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 550, al menos aproximadamente 600 o al menos aproximadamente 650, o más, de una molécula de ADN que tiene actividad 3' UTR como se describe en este documento. Los métodos para producir tales fragmentos a partir de una molécula 3' UTR inicial son bien conocidos en la técnica.

[56] Tal como se usa en el presente documento, el término “potenciador” o “elemento potenciador” se refiere a un elemento regulador *cis*–actuante, también conocido como *cis*–elemento, que confiere un aspecto del patrón general de expresión, pero por lo general es insuficiente solo para conducir la transcripción de una molécula de ADN transcribible operativamente unida. A diferencia de los promotores, los elementos potenciadores generalmente no incluyen un sitio de inicio de la transcripción (TSS) o una caja TATA o una 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 unida operativamente. Un elemento potenciador también puede fusionarse con un promotor para

producir un *cis*-elemento promotor quimérico, que confiere un aspecto de la modulación global de la expresión génica.

[57] Se cree que muchos elementos potenciadores del promotor se unen a las proteínas de unión al ADN y/o afectan la topología del ADN, produciendo conformaciones locales que permiten o restringen selectivamente el acceso de la ARN polimerasa a la plantilla de ADN o que facilitan la apertura selectiva de la doble hélice en el sitio de inicio de la transcripción. Un elemento potenciador puede funcionar para unir factores de transcripción que regulan la transcripción. Algunos elementos potenciadores se unen a más de un factor de transcripción, y los factores de transcripción pueden interactuar con diferentes afinidades con más de un dominio potenciador. Los elementos potenciadores pueden identificarse mediante una serie de técnicas, incluido el análisis de deleciones, es decir, la delección de uno o más nucleótidos del extremo 5' o interno a un promotor; análisis de proteínas de unión al ADN usando una huella de DNasa I, interferencia de metilación, ensayos de cambio de movilidad de electroforesis, huellas genómicas *in vivo* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediada por ligadura, y otros ensayos convencionales o por análisis de similitud de secuencia de ADN usando motivos de *cis*-elementos conocidos o elementos potenciadores como secuencia blanco o motivo blanco con métodos convencionales de comparación de secuencias de ADN, como BLAST. La estructura fina de un dominio potenciador puede estudiarse adicionalmente mediante mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o mediante otros métodos convencionales conocidos en la técnica. Los elementos potenciadores pueden obtenerse por síntesis química o por aislamiento a partir de elementos reguladores que incluyen dichos elementos, y pueden sintetizarse con nucleótidos flanqueantes adicionales que contienen sitios útiles de enzimas de restricción para facilitar la manipulación de subsecuencias. Por lo tanto, el diseño, la construcción y el uso de elementos potenciadores de acuerdo con los métodos descritos aquí para modular la expresión de moléculas de ADN transcribibles unidas operativamente están abarcados por la invención. Se proporciona un potenciador útil en la práctica de la invención como SEQ ID NO: 10, 14 y 15.

[58] En una forma de realización, se proporcionan fragmentos de una secuencia potenciadora descrita en el presente documento. Los fragmentos potenciadores pueden comprender actividad potenciadora, como se describe anteriormente, y pueden ser útiles solos o en combinación con otros elementos de expresión y fragmentos de elementos de expresión. En formas de realización específicas, se proporcionan fragmentos de un potenciador 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 350, al menos aproximadamente 400 o al menos aproximadamente 450, o más, de una molécula de ADN que tiene actividad potenciadora como se describe aquí. Los métodos para producir tales fragmentos a partir de una molécula potenciadora inicial son bien conocidos en la técnica.

[59] Tal como se usa en el presente documento, el término "quimérico" se refiere a una sola molécula de ADN producida fusionando una primera molécula de ADN con una segunda molécula de ADN, donde ni la primera ni la segunda molécula de ADN normalmente se encontrarían en esa configuración, es decir, fusionadas una a la otra. La molécula de ADN quimérico es, por lo tanto, una nueva molécula de ADN que normalmente no se encuentra en la naturaleza. Tal como se usa en el presente documento, el término "promotor quimérico" se refiere a un promotor producido a través de dicha manipulación de moléculas de ADN. Un "potenciador quimérico" se refiere a un potenciador producido a través de la manipulación de moléculas de ADN. Un "intrón quimérico" se refiere a un intrón producido a través de la manipulación de moléculas de ADN. Una "3' UTR quimérica" se refiere a una 3' UTR producida a través de la manipulación de moléculas de ADN. Un promotor, potenciador, intrón o 3' UTR quimérico puede combinar dos o más fragmentos de ADN, por ejemplo, la fusión de un promotor con un elemento potenciador. Por lo tanto, el diseño, la construcción y el uso de promotores, potenciadores, intrones o 3' UTR quiméricos de acuerdo con los métodos descritos aquí para modular la expresión de moléculas de ADN transcribibles unidas operativamente están abarcados por la presente invención.

[60] Los elementos reguladores quiméricos pueden diseñarse para comprender diversos elementos constituyentes que pueden estar unidos operativamente por diversos métodos conocidos en la técnica, tales como digestión y ligadura con enzimas de restricción, clonación independiente de ligadura, ensamblaje modular de productos de PCR durante la amplificación, o síntesis química directa del elemento regulador, así como otros métodos conocidos en la técnica. Los diversos elementos reguladores quiméricos resultantes pueden estar compuestos por los mismos elementos constitutivos, o variantes de los mismos, pero difieren en la secuencia de

ADN o las secuencias de ADN que comprenden la secuencia o las secuencias de ADN de enlace que permiten que las partes constituyentes estén operativamente unidas. En la invención, las secuencias de ADN proporcionadas como SEQ ID NOs: 2–8, 12–14 y 16–19 pueden proporcionar secuencias de referencia de elementos reguladores, en donde los elementos constitutivos que componen la secuencia de referencia pueden estar unidos mediante métodos conocidos en la técnica y pueden comprender sustituciones, deleciones y/o inserciones de uno o más nucleótidos o mutaciones que ocurren naturalmente en la transformación de células bacterianas y vegetales.

[61] Tal como se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a una segunda molécula de ADN, tal como un elemento regulador, que tiene una composición similar, pero no idéntica, a una primera molécula de ADN, y en donde la segunda molécula de ADN todavía mantiene la funcionalidad general, es decir, el mismo patrón de expresión o uno similar, por ejemplo, a través de una actividad transcripcional más o menos equivalente, de la primera molécula de ADN. Una variante puede ser una versión más corta o truncada de la primera molécula de ADN o una versión alterada de la secuencia de la primera molécula de ADN, tal como una con diferentes sitios de enzimas de restricción y/o deleciones, sustituciones o inserciones internas. Una "variante" también puede abarcar un elemento regulador que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, delección 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, menor o equivalente a la correspondiente molécula reguladora parental. Las "variantes" de elementos reguladores también abarcan variantes derivadas de mutaciones que ocurren naturalmente en la transformación de células bacterianas y vegetales. En la presente invención, una secuencia de polinucleótidos proporcionada como SEQ ID NOs: 2–8, 12–14 y 16–19 puede usarse para crear variantes que son similares en composición, pero no idénticas, a la secuencia de ADN del elemento regulador original, mientras se mantiene la funcionalidad general, es decir, el mismo patrón de expresión o uno similar, del elemento regulador original. La producción de tales variantes de la invención está dentro de la habilidad ordinaria de la técnica a la luz de la divulgación y está comprendida dentro del alcance de la invención.

[62] La eficacia de las modificaciones, duplicaciones o deleciones descritas en este documento sobre los aspectos de expresión deseados de un transgén particular puede probarse

empíricamente en ensayos de plantas estables y transitorios, como los descritos en los ejemplos de trabajo de este documento, a fin de validar los resultados, que pueden variar según los cambios realizados y el objetivo del cambio en la molécula de ADN inicial.

Constructos

[63] Tal como se usa en el presente documento, el término "constructo" significa cualquier molécula de ADN recombinante, como un plásmido, cósmido, virus, fago, o molécula de ADN o ARN lineal o circular, derivada de cualquier fuente, capaz de integración genómica o replicación autónoma, que comprende una molécula de ADN donde al menos una molécula de ADN se ha unido a otra molécula de ADN de manera funcionalmente operativa, es decir, operativamente unida. Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" significa cualquier constructo que pueda usarse con el propósito de transformación, es decir, la introducción de ADN o ARN heterólogo en una célula huésped. Un constructo típicamente incluye uno o más casetes de expresión. Tal como se usa en el presente documento, un "casete de expresión" se refiere a una molécula de ADN que comprende al menos una molécula de ADN transcribible operativamente unida a uno o más elementos reguladores, típicamente al menos un promotor y una 3' UTR.

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

[65] Los constructos de la invención pueden proporcionarse, en una forma de realización, como constructos de borde plasmídico inductor de tumor (Ti) doble que tienen las regiones de borde derecho (RB o AGRtu.RB) y borde izquierdo (LB o AGRtu.LB) del plásmido Ti aislado de *Agrobacterium tumefaciens* que comprende un T-DNA que, junto con las moléculas de transferencia proporcionadas por las células de *A. tumefaciens*, permiten la integración del T-DNA en el genoma de una célula vegetal (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 6.603.061).

Los constructos también pueden contener segmentos de ADN de la cadena principal del plásmido que proporcionan la función de replicación y la selección de antibióticos en células bacterianas, por ejemplo, un origen de replicación de *Escherichia coli* como ori322, un origen de replicación de amplio rango de huésped como oriV u oriRi, y una región de codificación para un marcador seleccionable tal como Spec/Strp que codifica para Tn7 aminoglucósido adeniltransferasa (*aadA*) que confiere resistencia a la espectinomicina o estreptomicina, o un gen marcador seleccionable de gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación de plantas, la cepa bacteriana huésped es a menudo ABI, C58 o LBA4404 de *A. tumefaciens*; sin embargo, otras cepas conocidas por los expertos en la técnica de transformación de plantas pueden funcionar en la invención.

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

[67] Se pueden incluir diversos elementos reguladores en un constructo, incluyendo cualquiera de los proporcionados aquí. Cualquiera de estos elementos reguladores se puede proporcionar en combinación con otros elementos reguladores. Dichas combinaciones pueden diseñarse o modificarse para producir características reguladoras deseables. En una forma de realización, los constructos de la invención comprenden al menos un elemento regulador unido operativamente a una molécula de ADN transcribible unida operativamente a una 3' UTR.

[68] Los constructos de la invención pueden incluir cualquier promotor o líder proporcionado aquí o conocido en la técnica. Por ejemplo, un promotor de la invención puede estar operativamente unido a un líder 5' no traducido heterólogo, tal como uno derivado de un gen de proteína de choque térmico. Alternativamente, un líder de la invención puede estar operativamente unido a un promotor heterólogo tal como el promotor del transcripto 35S del virus mosaico de la coliflor.

[69] Los casetes de expresión también pueden incluir una secuencia de codificación de péptidos de tránsito que codifica un péptido que es útil para el direccionamiento subcelular de una proteína operativamente unida, particularmente a un cloroplasto, leucoplasto u otra organela de plástido; mitocondrias; peroxisoma; vacuola; o una ubicación extracelular. Muchas proteínas localizadas en el cloroplasto se expresan a partir de genes nucleares como precursores y son direccionadas al cloroplasto por un péptido de tránsito de cloroplasto (CTP). Los ejemplos de tales proteínas de cloroplasto aisladas incluyen, pero sin limitaciones, aquellas asociadas con la subunidad pequeña (SSU) de ribulosa-1,5,-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidorreductasa, la proteína I y proteína II del complejo de recolección de luz, tiorredoxina F, y enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS). Los péptidos de tránsito de cloroplastos se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nro. 7.193.133. Se ha demostrado que las proteínas que no son cloroplastos pueden direccionarse al cloroplasto mediante la expresión de una CTP heteróloga operativamente unida al transgén que codifica una proteína que no es cloroplasto.

Moléculas de ADN transcribibles

[70] Tal como se usa en el presente documento, el término "molécula de ADN transcribible" se refiere a cualquier molécula de ADN capaz de transcribirse en una molécula de ARN, incluyendo, entre otras, aquellas que tienen secuencias codificantes de proteínas y aquellas que producen moléculas de ARN que tienen secuencias útiles para la supresión de genes. El tipo de molécula de ADN puede incluir, entre otros, 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 sintético, tal como una molécula de ADN que contiene un mensaje antisentido de un gen, o una molécula de ADN que codifica una versión artificial, sintética o modificada de otro modo de un transgén. Las moléculas de ADN transcribibles ejemplares para la incorporación en constructos de la invención incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN o genes de una especie distinta de la especie en la que se incorpora la molécula de ADN o genes que se originan o están presentes en la misma especie, pero son incorporados en las células receptoras por métodos de ingeniería genética en lugar de técnicas de reproducción clásicas.

[71] Un "transgén" se refiere a una molécula de ADN transcribible 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 transcribible incorporada artificialmente en el genoma de una célula huésped en la actual generación o cualquier anterior generación de la célula.

[72] Un elemento regulador, tal como un promotor, potenciador, intrón o 3' UTR de la invención, puede estar operativamente unido a una molécula de ADN transcribible que es heteróloga con respecto al elemento regulador. Tal como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" se refiere a la combinación de dos o más moléculas de ADN cuando dicha combinación normalmente no se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, las dos moléculas de ADN pueden derivarse de diferentes especies y/o las dos moléculas de ADN pueden derivarse de diferentes genes, por ejemplo, diferentes genes de la misma especie o los mismos genes de diferentes especies. Por lo tanto, un elemento regulador es heterólogo con respecto a una molécula de ADN transcribible unida operativamente si dicha combinación normalmente no se encuentra en la naturaleza, es decir, la molécula de ADN transcribible no ocurre naturalmente unida operativamente al elemento regulador.

[73] La molécula de ADN transcribible generalmente puede ser cualquier molécula de ADN para la que se desea la expresión de un transcripto. Dicha expresión de un transcripto puede dar como resultado la traducción de la molécula de ARNm resultante y, por lo tanto, la expresión de proteínas. Alternativamente, por ejemplo, una molécula de ADN transcribible puede diseñarse para finalmente causar una disminución de la expresión de un gen o proteína específicos. En una forma de realización, esto se puede lograr usando una molécula de ADN transcribible que esté orientada en dirección antisentido. El experto en la materia está familiarizado con el uso de dicha tecnología antisentido. Cualquier gen puede estar regulado negativamente de esta manera, y, en una forma de realización, una molécula de ADN transcribible puede diseñarse para la supresión de un gen específico mediante la expresión de una molécula de dsRNA, siRNA o miRNA.

[74] Por lo tanto, una forma de realización de la invención es una molécula de ADN recombinante que comprende un elemento regulador de la invención, como los proporcionados como SEQ ID NOs: 2–8, 12–14 y 16–19, operablemente unida a una molécula de ADN transcribible heteróloga de modo de modular la transcripción de la molécula de ADN transcribible en un nivel deseado o en un patrón deseado cuando el constructo se integra en el genoma de una célula vegetal transgénica. En una forma de realización, la molécula de ADN transcribible comprende una región codificante de proteínas de un gen, y en otra forma de realización, la molécula de ADN transcribible comprende una región antisentido de un gen.

Genes de interés agronómico

[75] Una molécula de ADN transcribible puede ser un gen de interés agronómico. Como se usa en el presente documento, el término "gen de interés agronómico" se refiere a una molécula de ADN transcribible que, cuando se expresa en un tejido vegetal, célula o tipo de célula particular, confiere una característica deseable. El producto de un gen de interés agronómico puede actuar dentro de la planta para causar un efecto sobre la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo, rendimiento, composición del grano, perfil nutricional, resistencia a enfermedades o plagas, y/o tolerancia ambiental o química de la planta, o puede actuar como agente pesticida en la dieta de una plaga que se alimenta de la planta. En una forma de realización de la invención, un elemento regulador de la invención se incorpora en un constructo de tal manera que el elemento regulador está operativamente unido a una molécula de ADN transcribible que es un gen de interés agronómico. En una planta transgénica que contiene tal constructo, la expresión del gen de interés agronómico puede conferir un rasgo agronómico beneficioso. Un rasgo agronómico beneficioso puede incluir, por ejemplo, pero sin limitaciones, tolerancia a herbicidas, control de insectos, rendimiento modificado, resistencia a enfermedades, resistencia a patógenos, crecimiento y desarrollo vegetal modificados, contenido de almidón modificado, contenido de aceite modificado, contenido de ácidos grasos modificado, contenido de proteína modificado, maduración de fruta modificada, nutrición animal y humana mejorada, producciones de biopolímeros, resistencia al estrés ambiental, péptidos farmacéuticos, cualidades de procesamiento mejoradas, sabor mejorado, utilidad de producción de semillas híbridas, producción de fibra mejorada, y producción deseable de biocombustibles.

[76] Entre los ejemplos de genes de interés agronómico conocidos en la técnica se incluyen los de resistencia a herbicidas (Patentes de los Estados Unidos Nros. 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), mayor rendimiento (Patentes de los Estados Unidos Nros. 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 de los Estados Unidos Nros. 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 de los Estados Unidos Nros. 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 de los Estados Unidos Nros. 6.617.496; 6.608.241; 6.015.940; 6.013.864; 5.850.023; y 5.304.730), resistencia a nemátodos (Patente de los Estados Unidos Nro. 6.228.992), resistencia a enfermedades bacterianas (Patente de los Estados Unidos Nro. 5.516.671), crecimiento y desarrollo vegetal (Patentes de los Estados Unidos Nros. 6.723.897 y 6.518.488), producción de almidón (Patentes de los Estados Unidos Nros. 6.538.181; 6.538.179; 6.538.178; 5.750.876; 6.476.295), producción de aceites modificada (Patentes de los Estados Unidos Nros. 6.444.876; 6.426.447; y 6.380.462), alta producción de aceite (Patentes de los Estados Unidos Nros. 6.495.739; 5.608.149; 6.483.008; y 6.476.295), contenido de ácidos grasos modificado (Patentes de los Estados Unidos Nros. 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), alta producción de proteína (Patente de los Estados Unidos Nro. 6.380.466), maduración de frutas (Patente de los Estados Unidos Nro. 5.512.466), nutrición animal y humana mejorada (Patentes de los Estados Unidos Nros. 6.723.837; 6.653.530; 6.5412.59; 5.985.605; y 6.171.640), biopolímeros (Patentes de los Estados Unidos Nros. USRE37.543; 6.228.623; y 5.958.745 y 6.946.588), resistencia al estrés ambiental (Patente de los Estados Unidos Nro. 6.072.103), péptidos farmacéuticos y péptidos secretables (Patentes de los Estados Unidos Nros. 6.812.379; 6.774.283; 6.140.075; y 6.080.560), rasgos de procesamiento mejorados (Patente de los Estados Unidos Nro. 6.476.295), digestibilidad mejorada (Patente de los Estados Unidos Nro. 6.531.648), baja rafinosa (Patente de los Estados Unidos Nro. 6.166.292), producción industrial de enzimas (Patente de los Estados Unidos Nro. 5.543.576), sabor mejorado (Patente de los Estados Unidos Nro. 6.011.199), fijación de nitrógeno (Patente de los Estados Unidos Nro. 5.229.114), producción de semillas híbridas (Patente de los Estados Unidos Nro. 5.689.041), producción de fibra (Patentes de los Estados Unidos Nros. 6.576.818; 6.271.443; 5.981.834; y 5.869.720) y producción de biocombustible (Patente de los Estados Unidos Nro. 5.998.700).

[77] Alternativamente, un gen de interés agronómico puede afectar las características o fenotipos vegetales mencionados anteriormente al codificar una molécula de ARN que causa la modulación dirigida de la expresión génica de un gen endógeno, por ejemplo, por antisentido (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 5.107.065); ARN inhibidor ("ARNi", que incluye la modulación de la expresión génica por mecanismos mediados por miRNA, siRNA,

siRNA transactuante y sRNA en fase, por ejemplo, como se describe en las solicitudes publicadas U.S. 2006/0200878 y U.S. 2008/0066206, y en la solicitud de patente estadounidense 11/974.469); o mecanismos mediados por cosupresión. El ARN también puede ser una molécula catalítica de ARN (por ejemplo, una ribozima o un riboswitch; véase, por ejemplo, el documento U.S. 2006/0200878) diseñada para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. Se conocen métodos en la técnica para construir e introducir constructos en una célula de tal manera que la molécula de ADN transcribible se transcriba en una molécula que es capaz de causar supresión génica.

Marcadores seleccionables

[78] Los transgenes marcadores seleccionables también pueden usarse con los elementos reguladores de la invención. Tal como se usa en el presente documento, el término "transgén marcador seleccionable" se refiere a cualquier molécula de ADN transcribible cuya expresión en una planta, tejido o célula transgénica, o la falta de ella, puede seleccionarse o calificarse de alguna manera. Los genes marcadores seleccionables, y sus técnicas de selección asociadas, para usar en la práctica de la invención son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitaciones, moléculas de ADN transcribibles que codifican β -glucuronidasa (GUS), proteína verde fluorescente (GFP), proteínas que confieren resistencia a antibióticos y proteínas que confieren tolerancia a herbicidas. Un ejemplo de un transgén marcador seleccionable se proporciona como SEQ ID NO: 11.

Transformación celular

[79] La invención también se dirige a un método para producir células y plantas transformadas que comprenden uno o más elementos reguladores unidos operativamente a una molécula de ADN transcribible.

[80] El término "transformación" se refiere a la introducción de una molécula de ADN en un huésped receptor. Tal como se usa en el presente documento, el término "huésped" se refiere a bacterias, hongos o plantas, incluidas las 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, plántulas, embriones y polen.

[81] Tal como se usa en el presente documento, el término "transformado" se refiere a una célula, tejido, órgano u organismo en el que se ha introducido una molécula de ADN extraña,

como un constructo. La molécula de ADN introducida puede integrarse en el ADN genómico de la célula, tejido, órgano u organismo receptor de modo que la progenie posterior herede la molécula de ADN introducida. Una célula u organismo "transgénico" o "transformado" también puede incluir la progenie de la célula u organismo y la progenie producida a partir de un programa de reproducción que emplea dicho organismo transgénico como padre en un cruce y exhibe un fenotipo alterado como resultado de la presencia de una molécula de ADN foránea. La molécula de ADN introducida también puede introducirse transitoriamente en la célula receptora de modo que la molécula de ADN introducida no sea heredada por la progenie posterior. El término "transgénico" se refiere a una bacteria, hongo o planta que contiene una o más moléculas de ADN heterólogo.

[82] Hay muchos métodos bien conocidos por los expertos en la técnica 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 células vegetales mediante la introducción de un constructo vegetal en un genoma vegetal en la práctica de esta invención pueden incluir cualquiera de los métodos bien conocidos y demostrados. Los métodos adecuados incluyen, entre otros, infección bacteriana (por ejemplo, *Agrobacterium*), vectores BAC binarios, suministro directo de ADN (por ejemplo, mediante transformación mediada por PEG, captación de ADN mediada por desecación / inhibición, electroporación, agitación con fibras de carburo de silicio y aceleración de partículas recubiertas de ADN), edición de genes (por ejemplo, sistemas CRISPR–Cas), entre otros.

[83] Las células huésped pueden ser cualquier célula u organismo, como una célula vegetal, una célula de alga, algas, células fúngicas, hongos, células bacterianas o células de insectos. En formas de realización específicas, las células huésped y las células transformadas pueden incluir células de plantas de cultivo.

[84] Una planta transgénica puede regenerarse posteriormente a partir de una célula vegetal transgénica de la invención. Usando técnicas de mejoramiento convencionales o autopolinización, se pueden producir semillas a partir de esta planta transgénica. Dichas semillas, y la planta de progenie resultante cultivada a partir de dichas semillas, contendrá la molécula de ADN recombinante de la invención y, por lo tanto, será transgénica.

[85] Las plantas transgénicas de la invención pueden autopolinizarse para proporcionar semillas para plantas transgénicas homocigotas de la invención (homocigotas para la molécula de ADN recombinante) o cruzarse con plantas no transgénicas o diferentes plantas transgénicas para proporcionar semillas para plantas transgénicas heterocigotas de la invención (heterocigota para la molécula de ADN recombinante). Ambas plantas transgénicas homocigotas y heterocigotas se denominan en el presente documento "plantas de progenie". Las plantas de progenie son plantas transgénicas que descienden de la planta transgénica original y que contienen la molécula de ADN recombinante de la invención. Las semillas producidas usando una planta transgénica de la invención pueden cosecharse y usarse para cultivar generaciones de plantas transgénicas, es decir, plantas de progenie de la invención, que comprenden el constructo de esta invención y que expresan un gen de interés agronómico. Las descripciones de los métodos de mejoramiento que se usan comúnmente para diferentes cultivos se pueden encontrar en uno de varios libros de referencia; véase, por ejemplo, Allard, *Principles of Plant Breeding*, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50–98 (1960); Simmonds, *Principles of Crop Improvement*, Longman, Inc., NY, 369–399 (1979); Sneep and Hendriksen, *Plant breeding Perspectives*, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, 2nd Edition, Monograph, 16:249 (1987); Fehr, *Principles of Variety Development, Theory and Technique*, (Vol. 1) and *Crop Species Soybean* (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360–376 (1987).

[86] Las plantas transformadas pueden analizarse para determinar 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. Los expertos en la materia conocen los numerosos métodos disponibles para el análisis de plantas transformadas. Por ejemplo, los métodos para el análisis de plantas incluyen, entre otros, transferencias Southern o Northern, enfoques basados en PCR, análisis bioquímicos, métodos de detección fenotípica, evaluaciones de campo y ensayos de inmunodiagnóstico. La expresión de una molécula de ADN transcribible se puede medir usando reactivos y métodos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA), como describe el fabricante, y tiempos de ciclo de PCR determinados usando la matriz de prueba TaqMan®. Alternativamente, se pueden usar los reactivos y métodos Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI), como describe el fabricante, para evaluar la expresión transgénica.

[87] La invención también proporciona partes de una planta de la invención. Las partes de planta incluyen, entre otras, hojas, tallos, raíces, tubérculos, semillas, endosperma, óvulos y polen. Las partes de planta de la invención pueden ser viables, no viables, regenerables y/o no regenerables. La invención también incluye y proporciona células vegetales transformadas que comprenden una molécula de ADN de la invención. Las células vegetales transformadas o transgénicas de la invención incluyen células vegetales regenerables y/o no regenerables.

[88] 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: 2–8, 12–14 y 16–19. Tal como se usa en el presente documento, un "producto básico" se refiere a cualquier composición o producto que se compone de material derivado de una planta transgénica, semilla, célula vegetal o parte de planta que contiene la molécula de ADN recombinante de la invención. Los productos básicos incluyen, entre otros, semillas procesadas, granos, partes de planta 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 puede usarse para determinar el contenido o la fuente del producto básico. Se puede usar cualquier método estándar de detección de moléculas de ADN, incluidos los métodos de detección descritos aquí.

[89] La invención puede entenderse más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitantes de la invención, a menos que se especifique lo contrario. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención. Sin embargo, los expertos en la materia deberían, a la luz de la presente descripción, apreciar que se pueden hacer muchos cambios en las formas de realización específicas que se describen y aún obtener un resultado similar o parecido sin apartarse del espíritu y alcance de la invención; por lo tanto, toda la materia expuesta debe interpretarse como ilustrativa y no en un sentido limitante.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Identificación y clonación de elementos reguladores

[90] Se identificaron nuevos elementos reguladores de la transcripción y un grupo de elementos de expresión reguladora (EXP) y se clonaron a partir de ADN genómico de varias especies monocotiledóneas.

[91] Las tres nuevas secuencias de región no traducida principal (3' UTR) se identificaron en secuencias patentadas de varias especies monocotiledóneas. La Tabla 1 a continuación muestra las diferentes 3' UTR y las especies monocotiledóneas de las cuales se derivaron. La 3' UTR, T-SETit.Ams1:1 (SEQ ID NO: 1) ha sido presentada previamente como SEQ ID NO: 270 en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos US20130031672.

Tabla 1. 3' UTR y géneros y especies correspondientes

Descripción	SEQ ID NO:	Género / especie
T-SETit.Ams1:1	1	<i>Setaria italica</i>
T-Cl.Hsp16.9_2:1	2	<i>Coix lacryma-jobi</i>
T-ERAtc.Hsp17.9:1	3	<i>Eragrostis tef</i>
T-ERlra.Hsp16.9_3:1	4	<i>Saccharum ravennae</i>
T-ANDge.Hsp/Sb.Hsp	5	Quimera derivada de <i>Andropogon gerardii</i> / <i>Sorghum bicolor</i>
T-SACra.Hsp16.9:2	12	<i>Saccharum ravennae</i>
T-Cl.Hsp16.9:2	13	<i>Coix lacryma-jobi</i>

[92] Además, se creó y se clonó una secuencia EXP que comprende un promotor (P-Zm.Ltp-1:1:2) y un líder (L-Zm.Ltp-1:1:3) aislado de ADN genómico de *Zea mays* y un intrón aislado de ADN genómico de *Setaria italica*. El EXP, EXP-Zm.LTP-SETit.Act4 (SEQ ID NO: 6) está compuesto por el promotor, P-Zm.Ltp-1:1:2 (SEQ ID NO: 7), unido operativamente 5' a la 5' UTR, L-Zm.Ltp-1:1:3 (SEQ ID NO: 8), unido operativamente 5' al intrón, I-SETit.Act4:2 (SEQ ID NO: 9; presentado previamente como SEQ ID NO: 627 en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos US20130031672).

[93] Estas 3' UTR y el EXP-Zm.LTP-SETit.Act4 se clonaron en vectores de transformación de plantas binarios usando métodos conocidos en la técnica.

Ejemplo 2

Análisis de las 3' UTR y su efecto sobre la expresión de un transgén en plantas de maíz transformadas de manera estable

[94] Las plantas de maíz se transformaron con vectores, específicamente vectores de expresión vegetal que contienen elementos reguladores de transcripción que impulsan la expresión del transgén de β -glucuronidasa (GUS) y uno de cada uno de los siete (7) elementos reguladores 3' UTR presentados en el Ejemplo 1. Las plantas resultantes se analizaron en cuanto a la expresión de la proteína GUS, para evaluar el efecto de los elementos reguladores 3' UTR en la expresión.

[95] Las plantas de maíz se transformaron con constructos de expresión GUS de plantas. Los elementos reguladores 3' UTR se clonaron en un vector de expresión de planta base usando métodos conocidos en la técnica. Los vectores de expresión de planta resultantes contenían una región de borde izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete de selección de transgén 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 3' UTR, que comprendía un potenciador derivado del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor en orientación complementaria inversa (E-CaMV.35S-RC, SEQ ID NO: 10), operativamente unido 5' al EXP, EXP-Zm.LTP-SETit.Act4 (SEQ ID NO: 6), operativamente unido 5' a una secuencia de codificación sintética diseñada para la expresión en una célula vegetal que codifica β -glucuronidasa (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1, SEQ ID NO: 11) que contiene un intrón procesable derivado del gen ST-LS1 específico de tejido inducible por luz de papa (acceso Genbank: X04753), unido operativamente 5' a uno de cada uno de los siete (7) elementos reguladores 3' UTR presentados en el Ejemplo 1, seguido de una región de borde derecho de *Agrobacterium tumefaciens*.

[96] Las células de plantas de maíz de la variedad de maíz 01DKD2 se transformaron usando estos constructos de vector de transformación binarios por transformación mediada por *Agrobacterium*, como es bien conocido en la técnica. Las células vegetales transformadas resultantes fueron inducidas para formar plantas de maíz enteras.

[97] El análisis GUS histoquímico se utilizó para el análisis de expresión cualitativa y cuantitativa de plantas transformadas. Se incubaron secciones de tejido entero con solución de tinción de GUS X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucurónido) (1 miligramo / mililitro) durante un período de tiempo apropiado, se enjuagaron y se inspeccionaron visualmente para ver si tenían coloración azul. La actividad de GUS se determinó cualitativamente por inspección visual directa o inspección bajo un microscopio utilizando órganos y tejidos vegetales seleccionados.

[98] Para el análisis cuantitativo de la expresión de GUS, se extrajo la proteína total de tejidos seleccionados de plantas de maíz transformadas. Se usó un microgramo de proteína total con el sustrato fluorogénico 4-metileumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) en un volumen de reacción total de 50 microlitros. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), tiene fluorescencia máxima 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 midió la fluorescencia con excitación a 365 nm, emisión a 445 nm usando un lector de microplacas FLUOstar® Omega. Los valores se proporcionan en unidades de nmol GUS / hora / mg de proteína total.

[99] Se tomaron muestras de los siguientes tejidos para determinar la expresión de GUS en cinco (5) de los elementos reguladores 3' UTR presentados en el Ejemplo 1 en la generación R₀: hoja y raíz en etapa V4; hoja y raíz en etapa V7; flor / antera, hoja y raíz en etapa VT; mazorca y seda en etapa R1; embrión de semilla y endosperma 21 días después de la polinización (DAP) en etapa R3. Las tablas 2 y 3 a continuación muestran el efecto de cada uno de los elementos reguladores 3' UTR en la expresión de GUS.

Tabla 2. Efecto de los elementos reguladores 3' UTR sobre la expresión cuantitativa de GUS en plantas de maíz R₀ transformadas de manera estable

V4	V7	VT
----	----	----

Descripción	SEQ ID NO:	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Flor / antera
T-SETit.Ams1:1	1	4017	303	2639	90	3862	213	249
T-Cl.Hsp16.9_2:1	2	4125	1491	3895	541	4842	2006	456
T-ERAtc.Hsp17.9:1	3	1817	247	2387	263	3863	493	142
T-ERlra.Hsp16.9_3:1	4	4995	1181	2217	476	2982	1022	395
T-ANDge.Hsp/Sb.Hsp	5	2892	583	1561	238	2750	537	296

Tabla 3. Efecto de los elementos reguladores 3' UTR sobre la expresión cuantitativa de GUS en plantas de maíz R₀ transformadas de manera estable

		R1	21 DAP	
Descripción	SEQ ID NO:	Mazorca / seda	Embrión	Endosperma
T-SETit.Ams1:1	1	1818	1254	638
T-Cl.Hsp16.9_2:1	2	4690	2403	176
T-ERAtc.Hsp17.9:1	3	1266	578	285
T-ERlra.Hsp16.9_3:1	4	1162	921	84
T-ANDge.Hsp/Sb.Hsp	5	2031	1353	140

[100] Como se puede ver en las Tablas 2 y 3, cada elemento regulador 3' UTR afectó la expresión de manera única en cada uno de los tejidos muestreados, cuando se unió operativamente a la misma combinación de constructor potenciador / promotor / intrón. Se determinó experimentalmente que el promotor P-Zm.Ltp-1:1:2 se expresa preferentemente en las raíces. La adición del potenciador, E-CaMV.35S-RC, agrega un componente de expresión constitutiva. Cada uno de los elementos reguladores 3' UTR modula la expresión impartida por la combinación de constructor potenciador / promotor / intrón. Por ejemplo, el 3' UTR, T-SETit.Ams1:1 mejoró la expresión raíz del constructo en relación con T-ERAtc.Hsp17.9:1 y T-ANDge.Hsp/Sb.Hsp. La expresión en hoja usando T-SETit.Ams1:1 fue mucho menor que la expresión en raíz. La expresión en raíces usando T-Cl.Hsp16.9_2:1 fue similarmente alta como las plantas de maíz que comprenden T-SETit.Ams1:1, pero la expresión en la hoja fue mayor en las plantas que comprendían T-Cl.Hsp16.9_2:1 en comparación con las plantas de maíz que comprendían T-SETit.Ams1:1. La expresión en raíz fue menor en las plantas de maíz que comprendían T-ERlra.Hsp16.9_3:1 en la etapa V4, pero aumentó progresivamente de la etapa

V7 a la VT. Con respecto a VT Flor y Antera, R1 Mazorca y Seda, y 21 DAP Embrión, la expresión fue mayor en las plantas de maíz que comprendían T–Cl.Hsp16.9_2:1 en comparación con los otros cuatro elementos reguladores 3' UTR. La expresión en 21 DAP Endosperma fue más alta en las plantas de maíz que comprendían T–SETit.Ams1:1 en comparación con los otros cuatro elementos reguladores 3' UTR.

[101] Las plantas de maíz también se transformaron con constructos de expresión GUS de planta como se describió anteriormente, que comprendían dos de los elementos reguladores 3' UTR presentados en el Ejemplo 1, T–SACra.Hsp16.9:2 (SEQ ID NO: 12) y T–Cl.Hsp16.9:2 (SEQ ID NO: 13). La expresión de GUS se determinó como se describió anteriormente. Solo se tomaron muestras de las hojas y raíces en etapa V2. La Tabla 4 a continuación muestra la expresión de GUS promedio para plantas de maíz transformadas de manera estable con constructos que comprendían los dos elementos reguladores 3' UTR.

Tabla 4. Efecto de los elementos reguladores 3' UTR sobre la expresión cuantitativa de GUS en plantas de maíz R₀ transformadas de manera estable

Descripción	SEQ ID NO:	V2 Hoja	V2 Raíz
T–SACra.Hsp16.9:2	12	987.66	6226.99
T–Cl.Hsp16.9:2	13	789.07	3299.47

[102] Como se puede ver en la Tabla 4 anterior, T–SACra.Hsp16.9:2 (SEQ ID NO: 12) proporcionó niveles generales más altos de expresión de GUS en la raíz y la hoja en comparación con T–Cl.Hsp16.9:2 (SEQ ID NO: 13). La expresión fue aproximadamente 6.3 veces mayor en la raíz que en la hoja para T–SACra.Hsp16.9:2. En comparación, la proporción de expresión de raíz a hoja para T–Cl.Hsp16.9: 2 fue menor que la de T–SACra.Hsp16.9:2 en aproximadamente 4.2 veces.

[103] Cada uno de los siete (7) elementos reguladores 3' UTR presentados anteriormente pudo modular la expresión del transgén GUS para proporcionar patrones únicos de expresión génica en diferentes tejidos. Estos patrones de expresión únicos pueden usarse para ajustar la expresión de transgenes específicos de interés para proporcionar un perfil de expresión en ciertos tejidos preferidos mientras se reduce la expresión en otros tejidos menos preferidos. Cada uno de

los siete elementos reguladores 3' UTR proporciona una gran flexibilidad para manejar ciertos rasgos en plantas transgénicas.

Ejemplo 3

Análisis de EXP-Zm.LTP-SETit.Act4 sobre la expresión de un transgén en plantas de maíz transformadas de manera estable

[104] Las plantas de maíz se transformaron con un vector, específicamente un vector de expresión de plantas que contiene elementos reguladores de la transcripción que impulsan la expresión del transgén de β -glucuronidasa (GUS). Las plantas resultantes se analizaron para determinar la expresión de la proteína GUS, para evaluar las propiedades de expresión del EXP, EXP-Zm.LTP-SETit.Act4 (SEQ ID NO: 6).

[105] Las plantas de maíz se transformaron con un constructo de expresión GUS de planta. El EXP, EXP-Zm.LTP-SETit.Act4 (SEQ ID NO: 6) se clonó en un vector de expresión de plantas base usando métodos conocidos en la técnica. El vector de expresión de planta resultante contenía una región de borde izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete de selección de transgén utilizado para la selección de células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato; un segundo casete transgénico para evaluar la actividad de EXP-Zm.LTP-SETit.Act4, que comprendía el EXP, EXP-Zm.LTP-SETit.Act4, unido operativamente 5' a una secuencia de codificación sintética diseñada para la expresión en una célula vegetal que codifica β -glucuronidasa (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1), unido operativamente 5' al elemento regulador 3' UTR, T-SETit.Ams1:1, seguido de una región de borde derecho de *Agrobacterium tumefaciens*.

[106] Las células de plantas de maíz de la variedad de maíz 01DKD2 se transformaron usando los constructos de vector de transformación binarios descritos anteriormente por transformación mediada por *Agrobacterium*, como es bien conocido en la técnica. Las células vegetales transformadas resultantes fueron inducidas para formar plantas de maíz enteras. Las mediciones cuantitativas y cualitativas de la expresión de GUS se determinaron como se describe en el ejemplo anterior usando hoja y raíces en etapa V2. La Tabla 5 muestra la expresión GUS

promedio para hojas y raíces V2 transformadas de manera estable y la relación de expresión GUS de la raíz en comparación con la hoja.

Tabla 5. Expresión GUS promedio y relación de expresión en hojas y raíces V2 impulsada por EXP–Zm.LTP–SETit.Act4 en plantas de maíz transformadas de forma estable

EXP–Zm.LTP–SETit.Act4		
Hoja	Raíz	Relación H/R
242.27	8513.02	35.14

[107] Como se puede ver en la Tabla 5, la expresión GUS impulsada por EXP–Zm.LTP–SETit.Act4 es mucho más alta en la raíz que en la hoja. La expresión en la raíz es más de treinta y cinco (35) veces la medida en la hoja. Este patrón de expresión puede ser ventajoso para impulsar ciertos transgenes donde la expresión en la raíz es más preferida que la expresión por encima del suelo.

Ejemplo 4

La orientación del potenciador afecta la relación de expresión entre raíces y hojas de plantas de maíz transformadas de manera estable

[108] Este ejemplo ilustra el efecto de unir operativamente un potenciador del virus del mosaico de Dalia en diferentes orientaciones a un promotor, alterando la expresión relativa de un transgén en hojas y raíces. Las plantas de maíz fueron transformadas con vectores de expresión de plantas que contienen un EXP que comprendía un promotor en una orientación directa o inversa en relación con un promotor nativo que comprende la secuencia potenciadora. Las plantas resultantes se analizaron para determinar el efecto de la orientación del potenciador sobre la expresión de la proteína GUS en raíces y hojas.

[109] Las plantas de maíz se transformaron con constructos de expresión GUS de plantas. Los EXP, EXP–DaMV.H–Flt+Zm.Ltp+SETit.Act4:1 (SEQ ID NO:16), EXP–DaMV.H–Flt+Zm.Ltp+Zm.Ltp+SETit.Act4:4 (SEQ ID NO:17), EXP–DaMV.FLT+Td.RCc3_1+SETit.14–3–3C–5:1 (SEQ ID NO:18), y EXP–DaMV.FLT+Td.RCc3_1+Td.RCc3_1+SETit.14–3–3C–5:5

(SEQ ID NO:19) se clonaron en un vector de expresión de plantas base usando métodos conocidos en la técnica. El vector de expresión de planta resultante contenía una región de borde izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete de selección de transgén utilizado para la selección de células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato; un segundo casete transgénico para evaluar la actividad de los EXP presentados anteriormente, unido operativamente 5' a una secuencia de codificación sintética diseñada para la expresión en una célula vegetal que codifica β -glucuronidasa (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:1), operativamente unido 5' al elemento regulador 3' UTR, T-SETit.Ams1:1, seguido de una región de borde derecho de *Agrobacterium tumefaciens*.

[110] Cada uno de los EXP comprendía un potenciador derivado de promotores del virus del mosaico de Dalia. Los potenciadores se unieron operativamente 5' al promotor respectivo de cada EXP en la orientación directa (la orientación del potenciador dentro del promotor nativo en el genoma del virus del mosaico de Dalia) o la orientación inversa (la orientación opuesta del potenciador dentro del promotor nativo en el genoma del virus del mosaico de Dalia). Los EXP, EXP-DaMV.H-Flt+Zm.Ltp+SETit.Act4:1 (SEQ ID NO:16) y EXP-DaMV.H-Flt+Zm.Ltp+Zm.Ltp+SETit.Act4:4 (SEQ ID NO:17) comprendían un potenciador reagrupado quimérico, E-DaMV.H-Flt:1 (SEQ ID NO: 14), derivado de múltiples promotores públicos del virus del mosaico de Dalia. Un primer fragmento se derivó del promotor de la cepa DaMV-Holland (DaMV-H), acceso Genbank EU090957, nucleótidos 1177-1494. Este fragmento estaba operativamente unido a un segundo fragmento derivado del promotor DaMV-H, nucleótidos 1003-1176. En la configuración del promotor DaMV nativo, el segundo fragmento precedería al primer fragmento. Dentro del primer fragmento, en relación con SEQ ID NO: 14, los nucleótidos 287 a 288, y los nucleótidos 319 a 322 se cambiaron a secuencias en ubicaciones análogas de un promotor DaMV dentro del acceso a Genbank JX272320. Los EXP, EXP-DaMV.FLT+Td.RCc3_1+SETit.14-3-3C-5:1 (SEQ ID NO:18) y EXP-DaMV.FLT+Td.RCc3_1+Td.RCc3_1+SETit.14-3-3C-5:5 (SEQ ID NO:19) comprendían un potenciador, E-DaMV.FLT:2 (SEQ ID NO:15), derivado de un promotor del virus del mosaico de Dalia, acceso a Genbank EF513491, nucleótidos 1 a 322.

[111] Los EXP, EXP-DaMV.H-Flt+Zm.Ltp+SETit.Act4:1 (SEQ ID NO:16) y EXP-DaMV.H-Flt+Zm.Ltp+Zm.Ltp+SETit.Act4:4 (SEQ ID NO:17) comprenden un potenciador reagrupado quimérico, E-DaMV.H-Flt:1 (SEQ ID NO:14), unido operativamente 5' al promotor

y 5' UTR derivado de una proteína de transferencia de lípidos –como el gen de la proteína de *Zea mays*, operativamente unido 5' a un intrón derivado de un gen de actina 4 de *Setaria italica*. Los EXP, EXP–DaMV.FLT + Td.RCc3_1 + SETit.14–3–3C–5: 1 (SEQ ID NO: 18) y EXP–DaMV.FLT + Td.RCc3_1 + Td.RCc3_1 + SETit.14– 3–3C–5: 5 (SEQ ID NO: 19) comprende un potenciador, E–DaMV.FLT: 2 (SEQ ID NO: 15), unido operativamente 5' al promotor y derivado 5' UTR de un gen RCc3 de *Trypsicum dactyloides*, operativamente unido 5' a un intrón derivado de un gen 14–3–3C de *Setaria italica*.

[112] Las células de plantas de maíz de la variedad de maíz 01DKD2 se transformaron usando los constructos de vector de transformación binarios descritos anteriormente por transformación mediada por *Agrobacterium*, como es bien conocido en la técnica. Las células vegetales transformadas resultantes fueron inducidas para formar plantas de maíz enteras. Las mediciones cuantitativas y cualitativas de la expresión de GUS se determinaron como se describe en el Ejemplo 2 usando la hoja y la raíz en etapa V2. La Tabla 6 muestra la expresión de GUS promedio para las hojas y raíces V2 transformadas de manera estable para cada uno de los cuatro (4) EXP. La orientación del potenciador y la relación de expresión en raíz a hoja también se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Expresión de GUS promedio, orientación del potenciador y relación de expresión en raíz a hoja en hojas y raíces V2 impulsada por los EXP en plantas de maíz transformadas de manera estable

EXP	SEQ ID NO:	Orientación del potenciador	Hoja GUS promedio	Raíz GUS promedio	Relación R/H
EXP–DaMV.H–Flt+Zm.Ltp+SETit.Act4:1	16	Inversa	3634	9896	2.72
EXP–DaMV.H–Flt+Zm.Ltp+Zm.Ltp+SETit.Act4:4	17	Directa	4486	9545	2.13
EXP–DaMV.FLT+Td.RCc3_1+SETit.14–3–3C–5:1	18	Inversa	6599	12392	1.88
EXP–DaMV.FLT+Td.RCc3_1+Td.RCc3_1+SETit.14–3–3C–5:5	19	Directa	6013	9201	1.53

[113] En el Ejemplo 3, Tabla 5, el EXP, EXP–Zm.LTP–SETit.Act4 (SEQ ID NO: 6) condujo la expresión de GUS mucho más alto en las raíces que en las hojas en más de treinta y cinco (35) veces. Como se muestra en la Tabla 6, al unir operativamente el potenciador reagrupado quimérico, E–DaMV.H–Flt:1 (SEQ ID NO: 14) 5' al promotor dentro de EXP–Zm.LTP–

SETit.Act4 que está comprendido dentro de EXP–DaMV.H–Flt+Zm.Ltp+SETit.Act4:1 (SEQ ID NO: 16) y EXP–DaMV.H–Flt+Zm.Ltp+Zm.Ltp+SETit.Act4:4 (SEQ ID NO: 17), la expresión de GUS aumentó en la hoja en relación con la raíz. Sin embargo, la orientación del potenciador dentro de estos dos EXP afectó los niveles relativos de expresión de GUS en la raíz y las hojas. La relación de expresión en raíz a hoja fue mayor cuando el E–DaMV.H–Flt:1 se orientó en la orientación inversa en comparación con la orientación directa. Del mismo modo, unir operativamente el potenciador E–DaMV.FLT:2 (SEQ ID NO: 15) dentro de EXP–DaMV.FLT+Td.RCc3_1+SETit.14–3–3C–5:1 (SEQ ID NO: 18) en la orientación inversa dio por resultado una relación de expresión GUS de raíz a hoja más alta en comparación con la orientación directa dentro de EXP–DaMV.FLT+Td.RCc3_1+Td.RCc3_1+SETit.14–3–3C–5:5 (SEQ ID NO: 19). Uniendo operativamente los dos potenciadores en la orientación inversa, se puede proporcionar un perfil de expresión que brinda una mayor relación de expresión de raíz a hoja que cuando los potenciadores se unen operativamente en la orientación directa. Esta característica es deseable cuando se desea aumentar la expresión utilizando un potenciador viral, pero se preferiría proporcionar la relación de expresión de raíz a hoja más alta posible.

[114] Habiendo ilustrado y descrito los principios de la presente invención, será evidente para los expertos en la materia que la invención puede modificarse en disposición y detalle sin apartarse de tales principios. Se reivindican todas las modificaciones que estén dentro del espíritu y el alcance de las reivindicaciones. Todas las publicaciones y documentos de patente publicados aquí citados se incorporan en la presente por referencia en la misma medida que si cada publicación o solicitud de patente individual se indicara específica e individualmente como incorporada por referencia.

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

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

- a) una secuencia con al menos 85% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOs: 2-8, 12-14 y 16-19;
- b) una secuencia que comprende cualquiera de SEQ ID NOs: 2-8, 12-14 y 16-19; y
- c) un fragmento de cualquiera de SEQ ID NOs: 2-8, 12-14 y 16-19, en donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes;

en donde dicha secuencia está operativamente unida a una molécula de ADN transcribible heteróloga.

2. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de ADN de cualquiera de SEQ ID NOs: 2-8, 12-14 y 16-19.

3. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de ADN de cualquiera de SEQ ID NOs: 2-8, 12-14 y 16-19.

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

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

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

7. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 5, en donde el gen de interés agronómico confiere resistencia a plagas en las plantas.
8. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1, en donde la molécula de ADN transcribible heteróloga codifica un dsRNA, un miRNA o un siRNA.
9. Una célula vegetal transgénica que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.
10. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 9, en donde dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal monocotiledónea.
11. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 9, en donde dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal dicotiledónea.
12. Una planta transgénica, o parte de ella, que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.
13. Una planta de progenie de la planta transgénica de la reivindicación 12, o una parte de la misma, en donde la planta de progenie o parte de la misma 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 para 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, en donde el producto básico es semillas, semillas procesadas, concentrado de proteína, aislado de proteína, almidón, granos, partes de plantas, aceite de semilla, biomasa y harina.
17. Un método para expresar una molécula de ADN transcribible que comprende obtener una planta transgénica que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1 y cultivar la planta, en donde se expresa el ADN transcribible.

RESUMEN

La invención proporciona moléculas y constructos de ADN recombinante, así como sus secuencias de nucleótidos, útiles para modular la expresión génica en plantas. La invención también proporciona plantas, células vegetales, partes de plantas y semillas transgénicas que comprenden las moléculas de ADN recombinante unidas operativamente a moléculas de ADN transcribibles heterólogas, así como métodos para su uso.