TÍTULO DE LA INVENCIÓN

ELEMENTOS REGULADORES DE LAS PLANTAS Y SUS USOS PARA LA AUTOESCISIÓN

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos No. 63/329,964, presentada el 12 de abril de 2022 que se incorpora aquí a modo de referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DE LA LISTA DE SECUENCIAS

[0002] La lista de secuencias que se encuentra en el archivo denominado "MONS556WO_ST26.xml", tiene 51 bytes (según se midió en Microsoft Windows®), se creó el 28 de marzo de 2023 y se adjunta a este archivo mediante presentación electrónica y se incorpora a modo de referencia en este documento.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0003] La invención se refiere al campo de la biología molecular de las plantas y a la ingeniería genética vegetal. Más específicamente, la invención se refiere a moléculas de ADN que son útiles para modular la expresión génica de recombinasa específica de un sitio, en las plantas.

ANTECEDENTES

[0004] Los elementos reguladores son elementos genéticos que regulan la actividad génica mediante la modulación de la transcripción de una secuencia de ADN transcribible ligada operativamente. Dichos elementos pueden ser promotores, líderes, intrones y regiones 3' no traducidas y resultan de utilidad en el campo de la biología molecular de las plantas y de la ingeniería genética vegetal.

[0005] El uso de la tecnología transgénica ha proporcionado muchos rasgos beneficiosos para los fines de la agricultura, pero se ha encontrado con varios desafíos. Una preocupación está relacionada con la presencia de genes marcadores que confieren resistencia a los antibióticos o los herbicidas en las plantas transgénicas. Además, puede haber otros casetes transgénicos o secuencias de ADN que han sido diseñados para un propósito particular y están presentes en la

transformación inicial, pero no son necesarios en el producto transgénico final. La eliminación de dichos genes marcadores y de otros casetes de expresión no deseados y secuencias de ADN es muy ventajoso en el campo de la biotecnología de las plantas.

[0006] Se han diseñado varias estrategias para la generación de plantas transgénicas libres de marcadores. Por ejemplo, la eliminación del casete de expresión del gen marcador se puede hacer utilizando un sistema de transformación de dos T-DNA o un sistema de recombinasa sitio-específica.

[0007] El sistema de transformación de dos ADN-T utiliza un vector binario de transformación de plantas que comprende dos ADN-T separados (sistema de transformación de dos ADN-T). Un ADN-T comprende el casete de expresión génica marcadora. El otro ADN-T comprende el (los) casete(s) de expresión para el(los) gen(es) de interés que están destinados a permanecer en la planta transgénica. La célula vegetal puede transformarse a través de la transformación mediada por *Agrobacterium*. Cada ADN-T se puede integrar en cromosomas separados del genoma de la célula vegetal transformada. Después de la transformación y de la regeneración de la planta, las plantas R_0 se autocruzan, originando la progenie R_1. Se seleccionan plantas de la progenie R_1 que tengan ADN-T que comprende el casete de expresión destinado al producto transgénico final, pero carecen del ADN-T que comprende el o los casete(s) de expresión génica marcadores (véase, por ejemplo, Komari, T. et al., (1996) *Vectors carying two separate T-DNAs fo co-transformation of higher plants mediated by Agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free from selection markers*, The Plant Journal, 10(1):165-174). El sistema de transformación de dos ADN-T tiene algunos inconvenientes con respecto a la eficiencia. En los dos sistemas de transformación de ADN-T, las plantas transformadoras R_0 pueden tener más de una copia de uno o ambos ADN-T que pueden tener que ser excluidos, y el porcentaje de plantas que pasan la selección que poseen solo una copia de cada ADN-T puede ser bajo.

[0008] Otro sistema para eliminar los casetes de expresión de genes marcadores de la planta transgénica se basa en la escisión mediante el uso de una recombinasa sitio-específica. Se pueden utilizar varias recombinasas sitio-específicas, como Cre-recombinasa, Flp-recombinasa (Lyznik, L. et al., (2000) *Gene Transfer Mediated by Site-Specific Recombination Systems,* Manual de Biología Molecular en Plantas), R-recombinasa (Machida, C. et al., (2000) *Use of the R-RS Site-Specific Recombination System in Plants*, Manual de Biología Molecular en Plantas N2, 1-23), o

G in-Recombinase (Maeser , S. y otros (1991). La recombinasa Gin del fago Mu puede catalizar la recombinación sitio-específica en protoplastos vegetales, Mol Gen Genet, 230: 170-176). Esencialmente, dentro del constructo, como una inserción del ADN-T, el o los casete(s) de expresión de genes marcadores están flanqueados por secuencias de reconocimiento de recombinasas sitio-específicas, de modo que la secuencia del constructo entre las secuencias de reconocimiento de las recombinasas sitio-específicas se puede extirpar mediante la expresión de la recombinasa. Los casetes de expresión que no pueden permanecer en la planta transgénica después de la escisión están presentes en el constructo fuera de las secuencias de reconocimiento de las recombinasas sitio-específicas del constructo.

[0009] La eliminación de los casetes de expresión flanqueados por las secuencias de reconocimiento de las recombinasas sitio-específicas se puede lograr utilizando una estrategia de cruce o a través de la autoescisión. En una estrategia de cruce, las plantas (por ejemplo, la progenie R1) preferentemente homocigotas para la presencia del constructo se cruzan con otra línea de plantas transgénicas transformadas con un casete de expresión utilizado para la expresión de la recombinasa sitio-específica. La progenie F1 resultante se selecciona entonces para la presencia del constructo que ha tenido los casetes de expresión flanqueados por las secuencias de reconocimiento de las recombinasas sitio-específicas. En el caso de la autoescisión, se presenta en el constructo otro casete adicional de expresión que codifica una recombinasa sitio-específica, estando el o los otro(s) casete(s) de expresión a ser escindidos entre o flanqueados por las secuencias de reconocimiento de la recombinasa sitio-específica, de modo que todos estos casetes de expresión son escindidos por la recombinasa sitio-específica. A menudo, un promotor tendrá una preferencia o especificidad para impulsar la expresión en un tipo específico de célula o tejido. No todos los promotores y elementos de expresión son adecuados para una autoescisión eficiente, y se necesita mucha experimentación para identificar al promotor correcto que impulse la expresión de recombinasa junto con elementos de expresión adicionales, como intrones y 3' UTR, que modulan la expresión de la recombinasa para lograr la frecuencia de escisión y el resultado deseados.

[0010] Existe la necesidad de elementos de expresión que impulsen la autoescisión eficiente en las plantas de cultivo. La presente revelación proporciona varios elementos de expresión identificados a través de muchos años de experimentación que se pueden usar para impulsar la expresión de una recombinasa y producir una autoescisión eficiente del marcador y / o transgenes de recombinasa

y posiblemente otros casetes de expresión en varias especies de cultivos después de la transformación.

SÍNTESIS

[0011] La invención proporciona elementos reguladores de genes que se utilicen en plantas para conducir una recombinasa sitio-específica que dará como resultado una autoescisión eficiente de casetes de expresión de genes marcadores, así como casetes de expresión utilizados en la edición del genoma. La invención también proporciona constructos de moléculas de ADN recombinantes que comprenden los elementos reguladores. La presente invención también proporciona constructos que comprenden los elementos reguladores. En una forma de realización, los elementos reguladores están vinculados operativamente a una recombinasa sitio-específica. En sus formas de realización, los elementos reguladores están comprendidos dentro de constructos que comprenden al menos tres casetes transgénicos. La presente invención también proporciona métodos para utilizar los elementos reguladores y hacer y utilizar las moléculas de ADN recombinante y las estructuras que comprenden los elementos reguladores. La presente invención también proporciona una secuencia codificante Cre-recombinasa sintética para su expresión en una célula vegetal.

[0012] Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia reguladora del ADN seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos alrededor del 80 por ciento de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de los números de identificadores de secuencia SEQ ID NO:1-15; b) una secuencia que comprenda cualquiera de los SEQ ID NO:1-15; y (c) un fragmento de (i) cualquiera de los SEQ ID NO:1-15 o (ii) cualquier secuencia con al menos un 80 por ciento de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de los SEQ ID NO:1-15, en donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; donde la secuencia está vinculada operativamente a una secuencia de ADN transcribible heteróloga que codifica una recombinasa sitio-específica. En formas específicas de realización, el constructo de ADN recombinante comprende una secuencia reguladora del ADN que tiene al menos alrededor del 80 por ciento, al menos alrededor del 81 por ciento, al menos alrededor del 82 por ciento, al menos alrededor del 83 por ciento, al menos alrededor del 84 por ciento, al menos alrededor del 85 por ciento, al menos alrededor del 86 por ciento, al menos alrededor del 87 por ciento, al menos alrededor del 88 por ciento, al menos alrededor del 89 por

ciento, al menos alrededor del 90 por ciento, al menos el 91 por ciento, al menos el 92 por ciento, al menos el 93 por ciento, al menos el 94 por ciento, al menos el 95 por ciento, al menos el 96 por ciento, al menos el 97 por ciento, al menos el 98 por ciento, o al menos el 99 por ciento de la identidad de secuencia a la secuencia de ADN de cualquiera de los NO: 1-15. En formas de realización particulares, la secuencia reguladora del ADN comprende un elemento regulador con actividad reguladora de genes. En lasformas de realización some, el elemento regulador comprende un promotor. En otras formas de realización, el elemento regulador comprende un intrón. En otras formas de realización, el elemento regulador comprende un 3' UTR. En otras formas de realización, la secuencia de ADN transcripible heterólogacomprende un gen que codifica una recombinasa sitio-específica. En otras formas de realización, la recombinasa sitio-específica se selecciona del grupo que consiste en una Cre-recombinasa, una Flp-recombinasa, una R-recombinasa y una Gin-recombinasa. En otra forma de forma de realización, la recombinasa sitio-específica es una Cre-recombinasa.

[0013] En otro aspecto, el constructo de ADN recombinante comprende además uno o ambos de los siguientes casetes de expresión: un transgén marcador seleccionable; y/o un transgén de interés agronómico. En otra forma de realización, el constructo de ADN recombinante comprende además un par de secuencias de recombinación sitio-específica que flanquean una o ambas secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica y / o el transgén marcador seleccionable, donde los sitios de recombinación sitio-específica pueden ser escindidos por la recombinasa sitio-específica. En otras formas de realización, el transgén marcador seleccionable del constructo de ADN recombinante confiere resistencia a un herbicida o antibiótico. En otras formas de realización, las secuencias del sitio de recombinación sitio-específica del constructo de ADN recombinante se seleccionan del grupo que consiste en LoxP, FRT, RS y GIX. En formas específicas de realización, las secuencias del sitio de recombinación sitio-específica del constructo de ADN recombinado son cada una un sitio LoxP. En otras formas de realización, la secuencia del sitio de recombinación sitio-específica del constructo de ADN recombinante comprende cada una el SEQ ID NO: 20.

[0014] En otro aspecto, el transgén de interés agronómico del constructo de ADN recombinante confiere tolerancia herbicida en las plantas. En algunas formas de realización, el transgén de interés agronómico del constructo de ADN recombinante confiere resistencia a plagas o enfermedades en las plantas. En otras formas de realización, el transgén de interés agronómico del constructo de

ADN recombinante confiere un mayor rendimiento o tolerancia al estrés en las plantas. En otras formas de realización, el transgén de interés agronómico del constructo de ADN recombinante codifica un ARN-bc, un micro-ARN o un ARN-interferente.

[0015] En otro aspecto, el constructo de ADN recombinante comprende uno o ambos de los siguientes: un casete de expresión que codifica un ARN guía; y/o un casete de expresión que codifica una nucleasa sitio-específica. El constructo de ADN recombinante también comprende secuencias de sitio de recombinación sitio-específica que flanquean una o más de la secuencia de ADN transcribible que codifica la recombinasa sitio-específica, el transgén marcador seleccionable, el casete de expresión que codifica el ARN guía y / o el casete de expresión que codifica la nucleasa sitio-específica, donde los sitios de recombinación sitio-específica pueden ser hendidos por la recombinasa sitio-específica. En otras formas de realización, el ARN guía comprende una secuencia dirigida que tiene como objetivo una secuencia en el genoma de una célula eucariota para la edición del genoma o la integración sitio-específica. En otra forma de realización, la célula eucariota es una célula vegetal. En otra forma de realización, el constructo de ADN recombinante comprende dos o más casetes de expresión que codifican dos o más ARN guía. En aún otra forma adicional de realización, el constructo del ADN recombinante comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez casetes de expresión diferentes que codifican al ARN guía. En nuevas formas de realización, la nucleasa sitio-específica es una endonucleasa guiada por ARN o una nucleasa asociada a CRISPR. En otra forma de realización, la endonucleasa guía de ARN o nucleasa asociada a CRISPR se selecciona del grupo formado por Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9, Cas10, Cas12a, Cys1, Cys2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, CasX y CasY. En formas específicas de realización, la endonucleasa guiada por ARN o nucleasa asociada a CRISPR es Cas12a o Cas9.

[0016] En otro aspecto, se provee aquí una molécula o vector de ADN que comprende el constructo de ADN recombinante. En otra forma de realización, un vector de transformación de ADN comprende el constructo de ADN recombinante y un segmento de ADN-T limitado por un borde izquierdo y un borde derecho. En otras formas de realización, la secuencia de ADN transcribible que codifica la recombinasa sitio-específica se encuentra entre el borde izquierdo y el borde derecho del segmento de ADN-T dentro del vector de transformación del ADN. En otra forma de

realización, el vector de transformación de ADN comprende el constructo de ADN recombinante y un segmento de ADN-T con un borde izquierdo y un borde derecho, donde una o más de las secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica, el transgén marcador seleccionable y/o el transgén de interés agronómico se encuentran entre el borde izquierdo y el borde derecho del segmento de ADN-T. En otras formas de realización, el vector de transformación de ADN comprende el constructo de ADN recombinante y un segmento de ADN-T con un borde izquierdo y borde derecho, donde una o más de las secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica, el transgén marcador seleccionable, el transgén de interés agronómico, el casete de expresión que codifica el ARN guía y/o el casete de expresión que codifica la nucleasa sitio-específica se encuentra entre el borde izquierdo y el borde derecho del segmento de ADN-T.

[0017] En otro aspecto, se provee aquí una planta transgénica, una parte de una planta o una célula vegetal que comprende el constructo de ADN recombinante. El constructo del ADN recombinante se transforma en el genoma de la planta, parte de la planta o célula vegetal transgénica. La planta, parte de la planta o célula vegetal transgénica es una planta de maíz, soja, algodón o canola, parte de la planta o célula vegetal. También se provee aquí, una célula bacteriana que comprende el constructo de ADN recombinante o el vector de transformación.

[0018] En otro aspecto, se provee aquí un método para producir una planta transgénica o parte de una planta, que comprende (a) transformar una célula vegetal de un explante con una molécula o vector de ADN que comprende el constructo de ADN recombinante para producir una o más células vegetales transformadas que comprenden el constructo de ADN recombinante transformado de manera estable en el genoma de una o más células vegetales transformadas; b) regenerar o desarrollar una planta transgénica a partir del explante, en la que la planta transgénica comprenda el constructo de ADN recombinante transformada de forma estable en el genoma de una o más células de la planta transgénica. En una forma de realización, la célula vegetal se transforma a través de la transformación mediada por *Agrobacterium* o la transformación mediada por *Rhizobium*. En otra forma de realización, la célula vegetal se transforma a través de la transformación mediada por microproyectiles o la transformación mediada por bombardeo de partículas. En aún otra forma de realización, la planta transgénica y la célula vegetal son una planta de maíz, soja, algodón o canola y una célula vegetal, respectivamente. En otra forma de realización, el método comprende además: (c) separar o cosechar parte de la planta transgénica.

[0019] En otro aspecto, se provee aquí un método para extirpar un casete de expresión del genoma de una planta transgénica, que comprende: (a) transformar una célula vegetal con una molécula o vector de ADN que comprende el constructo de ADN recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 8-25 para producir una o más células vegetales transformadas que comprenden el constructo de ADN recombinante transformado de manera estable en el genoma de una o más células vegetales transformadas; (b) regenerar o desarrollar una planta transgénica, al menos en parte, a partir de una o más células vegetales transformadas de forma estable; (c) cruzar la planta transgénica consigo misma o con otra planta; y (d) seleccionar una o más plantas de progenie en las que una o ambas secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica y/o el transgén marcador seleccionable entre el par de secuelas del sitio de recombinación sitio-específica del constructo de ADN recombinante se extirpen y ya no estén presentes en el genoma de las plantas de la progenie. En otras formas de realización del método, el constructo de ADN recombinante comprende además uno o ambos de los siguientes casetes de expresión entre el par de secuencias de sitios de recombinación específicos del sitio del constructo de ADN recombinante: un casete de expresión que codifica un ARN guía y/o un casete de expresión que codifica una nucleasa sitio-específica, y donde se seleccionan una o más plantas de progenie en las que una o más de las secuencias de ADN transcribible que codifica la recombinasa sitio-específica, el transgén marcador seleccionable, el casete de expresión que codifica el ARN guía y/o el casete de expresión que codifica la nucleasa sitio-específica del constructo de ADN recombinante se extirpan y ya no están presentes en el genoma de las plantas de la progenie. En formas específicas de realización, la planta transgénica y la célula vegetal son una planta de maíz, soja, algodón o canola y una célula vegetal, respectivamente. En otra forma de realización, el método comprende (e) separar o cosechar una parte de la planta de una o más de las plantas de la progenie. En otra forma de realización, el método comprende además (f) cruzar una o más de las plantas de la progenie consigo misma o con otra planta.

[0020] En otro aspecto, la invención provee un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos alrededor del 85 por ciento de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14; (b) una secuencia que comprende cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14; y (c) un fragmento de cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14, donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; donde la secuencia está vinculada operativamente a una

molécula de ADN transcribible heteróloga. En formas específicas de realización, el constructo de ADN recombinante comprende una secuencia de ADN que tiene al menos alrededor del 85 por ciento, al menos alrededor del 86 por ciento, al menos alrededor del 87 por ciento, al menos alrededor del 88 por ciento, al menos alrededor del 89 por ciento, al menos alrededor del 90 por ciento, al menos el 91 por ciento, al menos el 92 por ciento, al menos el 93 por ciento, al menos el 94 por ciento, al menos el 95 por ciento, al menos el 96 por ciento, al menos el 97 por ciento, al menos el 98 por ciento o al menos el 99 por ciento de la identidad de secuencia de ADN de cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14.

[0021] En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan células vegetales transgénicas que comprenden un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia con al menos alrededor del 85 por ciento de identidad de secuencia a cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14; (b) una secuencia que comprenda cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14; y (c) un fragmento de cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14, donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; donde la secuencia de ADN está vinculada operativamente 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 dicotiledónea.

[0022] En aún otro aspecto, se provee además un efecto transgénico, o parte del mismo, que comprende un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en: a) una secuencia con al menos un 85 por ciento de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14; b) una secuencia que comprende cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14; y c) un fragmento de cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14, donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes; donde la secuencia está vinculada operativamente a una molécula de ADN transcribible heteróloga. En formas específicas de realización, la planta transgénica es una planta progenie de cualquier generación que comprende la molécula de ADN recombinante. También se provee una semilla transgénica que comprende la molécula de ADN recombinante que produce una planta transgénica cuando se cultiva.

[0023] En otro aspecto, la invención provee un método para producir un commodity que comprende la obtención de una planta transgénica o parte de la misma que contiene un constructo de ADN recombinante de la invención y la producción de un commodity a partir de la misma. En una forma de realización, el commodity consiste en semillas, semillas procesadas, concentrado de proteína, aislado de proteína, almidón, granos, partes de plantas, aceite de semillas, biomasa, harina y harina.

[0024] En aún otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una planta transgénica que comprende un constructo de ADN recombinante de la invención que comprende la transformación de una célula vegetal con el constructo de ADN recombinante de la invención para producir una célula vegetal transformada y regenerar una planta transgénica a partir de la célula vegetal transformada.

[0025] En otro aspecto, se provee aquí una secuencia codificante sintética Cre-recombinasa diseñada para expresarse en una célula vegetal que tiene al menos alrededor del 90 por ciento, al menos 91 por ciento, al menos 92 por ciento, al menos 93 por ciento, al menos 94 por ciento, al menos 95 por ciento, al menos 96 por ciento, al menos 97 por ciento, al menos 98 por ciento, o al menos el 99 por ciento de la identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ADN de SEQ ID NO:17.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

[0026] **SEQ ID NO:1** es una secuencia de ADN de un grupo de elementos de expresión reguladora (EXP), EXP-Zm.BabyBoom2 que comprende un promotor (P-Zm.BabyBoom2:2) vinculado operativamente 5' a un líder (L-Zm.BabyBoom2:1), vinculado operativamente 5' a un intrón (I-Zm.BabyBoom2:1).

[0027] **SEQ ID NO:2** es una secuela de ADN de un promotor, P-Zm.BabyBoom2:2.

[0028] **SEQ ID NO:3** es una secuencia de ADN de un líder, L-Zm.BabyBoom2:1.

[0029] **SEQ ID NO:4** es una secuencia de ADN de un intrón, I-Zm.BabyBoom2:1.

[0030] **SEQ ID NO:5** es una secuencia de ADN de un 3' UTR, T-Zm.BabyBoom2:1.

[0031] **SEQ ID NO:6** es una secuencia de ADN de un EXP, EXP-Zm.GRMZM2G512113_GSI85 que comprende un promotor y líder (P-Zm.GRMZM2G512113:1) vinculado operativamente 5' a un intrón, I-Zm.GSI85.nno:1.

[0032] **SEQ ID NO:7** es una secuencia de ADN de un promotor y líder, P-Zm.GRMZM2G512113:1.

[0033] **SEQ ID NO:8** es una secuencia de ADN de un intrón sintético, I-Zm.GSI85.nno:1.

[0034] **SEQ ID NO:9** es una secuencia de ADN de un 3' UTR, T-Zm.GRMZM2G512113:1.

[0035] **SEQ ID NO:10** es la secuencia de ADN de un EXP, EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 que comprende un promotor (P-SETvi.SPO11-1:1) vinculado operativamente 5' a un líder (L-SETvi.SPO11-1:1), vinculado operativamente 5' a un intrón (I-SETit.Eef7:2).

[0036] **SEQ ID NO:11** es una secuencia de ADN de un promotor, P-SETvi.SPO11-1:1.

[0037] **SEQ ID NO:12** es una secuencia de ADN de un líder, L-SETvi.SPO11-1:1.

[0038] **SEQ ID NO:13** es una secuencia de ADN de un intrón, I-SETit.Eef7:2.

[0039] **SEQ ID NO:14** es una secuencia de ADN de un 3' UTR, T-SETvi.SPO11-1:1.

[0040] **SEQ ID NO:15** es una secuencia de ADN de un 3' UTR, T-SACra.Hsp16.9:29.

[0041] **SEQ ID NO:16** es una secuencia de ADN de una secuencia codificante que codifica Cre-recombinasa (GOI-Cre_1) que comprende un intrón procesable utilizado para la expresión en una célula vegetal.

[0042] **SEQ ID NO:17** es una secuencia de ADN de una secuencia codificante sintética que codifica Cre-recombinasa (GOI-Cre_2) que comprende un intrón procesable utilizado para la expresión en una célula vegetal.

[0043] **SEQ ID NO:18** es una secuencia de ADN de una secuencia codificante que codifica la β–glucuronidasa (GUS) que comprende un intrón procesable.

[0044] **SEQ ID NO:19** es una secuencia de ADN de una secuencia codificante sintética que codifica la molécula de toxina de insecto TIC10746_3 utiliza para la expresión en una célula vegetal.

[0045] **SEQ ID NO:20** es una secuencia de ADN de una secuencia de reconocimiento de Cre-recombinasa, LoxP.

[0046] **SEQ ID NO:21** es una secuencia de ADN de una secuencia codificante sintética que codifica el marcador seleccionable, GOI-CP4-EPSPS utilizado para la selección de células vegetales transformadas utilizando una selección de glifosato.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0047] La invención provee elementos reguladores de genes para su uso en plantas para impulsar la expresión de una recombinasa sitio-específica que dará lugar a una autoescisión eficiente de casetes de expresión génica marcadora. La invención también provee constructos y moléculas de ADN recombinante que comprenden los elementos reguladores. La invención también proporciona métodos para la autoescisión de al menos dos casetes de expresión transgénica del genoma de una planta transgénica mediante el uso de un constructo que comprende un casete transgénico en el que los elementos reguladores de genes descriptos en este documento están vinculados operativamente a un gen de recombinasa sitio-específica.

[0048] Las siguientes definiciones se proporcionan para determinados términos y frases utilizados en el presente documento. A menos que se defina lo contrario en la presente revelación, los términos y frases utilizados en el presente documento deben ser entendidos por los expertos y conocedores en la técnica, de acuerdo con su significado convencional.

Recombinasas sitio-específicas y escisión de un segmento de ADN

[0049] Tal como se usa en la presente invención, una "recombinasa sitio-específica" es una enzima que se une a secuencias específicas de reconocimiento de ADN y cataliza la escisión del ADN, el intercambio de cadenas de ADN y la reunificación del ADN entre dos secuencias de sitios de recombinasa sitio-específicas. "Recombinación sitio-específica" o "sistema de recombinasa sitio-específica", o "tecnologías de recombinasa sitio-específicas ", o "recombinación dirigida al sitio", o "sistema de recombinasa dirigida al sitio" o "tecnologías de recombinasa dirigida al sitio", describen una variedad de procesos de recombinación especializados que implican el intercambio recíproco entre sitios de ADN definidos. Tal como se lo emplea en la presente invención, el

término "flanqueo" se refiere a dos o más secuencias, como las secuencias de sitios de recombinación específicos del sitio, que se encuentran a ambos lados de uno o más locus/loci, gen(es), secuencia(s), transgén(es) o casete(s) de expresión. Las secuencias del sitio de recombinación sitio- específica pueden clonarse dentro de un constructo de ADN recombinante 5' y 3' en relación con un segmento de ADN (es decir, flanqueando el segmento de ADN) que comprende los casetes de expresión bajo los cuales tendrá lugar la recombinación. Dependiendo de la disposición inicial de los sitios de recombinación específicos del sitio parental, la recombinación sitio-específica tiene uno de tres resultados posibles: integración (inserción de un segmento de ADN extraño), escisión (eliminación de un segmento de ADN) o inversión (rotación de un segmento de ADN 180 grados antes de volver a unir los dos fragmentos finales). La integración resulta de la recombinación entre sitios en moléculas de ADN separadas (siempre que al menos uno de los cromosomas parentales sea circular) y tenga lugar con una orientación definida de forma única.

[0050] Para los sitios de recombinación ubicados en la misma molécula de ADN o cromosoma, el resultado puede determinarse por su orientación relativa. Mientras que la inversión de un segmento de ADN puede resultar del intercambio entre sitios invertidos (cabeza a cabeza), la escisión puede resultar de la recombinación entre sitios en una orientación de cabeza a cola (*Nigel et al. (2006) Mechanisms of Site-Specific Recombination. Annu. Biochem, 75: 567-605*). Se pueden utilizar varias recombinasas sitio-sitio-específicas para la escisión de ADN entre dos sitios de reconocimiento de recombinasas sitio-específicas, como la Cre-recombinasa que reconoce los elementos de Lox, la Flp-recombinasa que reconoce los sitios FRT (véase, por ejemplo, Lyznik, L. et al., (2000) Gene Transfer Mediated by Site-Specific Recombination Systems, Plant Molecular Biology Manual N1, 1-26), R-recombinasa que reconoce sitios RS (véase, por ejemplo, Machida, C. et al., (2000) *Use of the R-RS Site-Specific Recombination System in Plants, Plant Molecular Biology Manual N2, 1-23*), o Gin-Recombinasa que reconoce sitios GIX (véase, por ejemplo, Maeser, S. et al., (1991). La Gin recombinasa del fago Mu puede catalizar recombinación sitio-específico en protoplastos vegetales, Mol Gen Genet, 230: 170-176). Se ha demostrado que cada uno de los sistemas antes mencionados de recombinasa sitio-específica funciona en plantas. El sistema de recombinasa sitio-específica Cre/Lox es el sistema más frecuentemente utilizado para la escisión de marcas en biotecnología vegetal.

[0051] Las recombinasas sitio-específicas se pueden utilizar en biotecnología vegetal para eliminar casetes de expresión génica marcadores, así como otros casetes de expresión y segmentos de ADN de una planta transgénica. Normalmente, una planta se transforma con un constructo o vector de ADN recombinante que comprende casetes de expresión múltiple. Los casetes de expresión se pueden utilizar para expresar transgenes que proporcionan características favorables a la planta, así como transgenes utilizados como marcadores para seleccionar las células vegetales transformadas, como genes resistentes a antibióticos, genes tolerantes a herbicidas u otros transgenes útiles en el proceso de selección. Los casetes transgénicos para los genes marcadores están flanqueados por un par de sitios de reconocimiento de recombinasas sitio-específicas. Después de la transformación y selección, se cultivan las plantas transformadas regeneradas. La escisión de los genes marcadores se puede eliminar a través de varias estrategias de cruce, ya sea mediante el cruce con una línea de plantas que expresan recombinasas sitio-específicas o mediante la autoescisión.

[0052] El cruce utilizando una línea de plantas que expresan recombinasas sitio-específicas a menudo se lleva a cabo de la siguiente manera. Las plantas transformadas R_0 pueden autocruzarse. A continuación, se seleccionan plantas de progenie R_1 para detectar la presencia de la estructura de ADN recombinante. A continuación, se permite que las plantas de progenie R_1 seleccionadas se auto-crucen, y se seleccionan plantas de progenie R_2 que son homocigotas para la inserción del constructo de ADN recombinante. Las plantas homocigotas de la progenie R_2 se cruzan con otra línea que expresa una recombinasa. Como resultado de este cruce, la recombinasa extirpa los casetes de expresión génica marcadores que están flanqueados por las secuencias de reconocimiento de recombinasas sitio-específicas, de donde resultan plantas de progenie F1 que comprenden el (los) casete(s) de expresión deseado(s) pero con el (los) casete(s) de expresión génica marcador(es) extirpados del genoma. A la progenie F_1 resultante se le permite auto-cruzarse, y se seleccionan plantas de progenie F_2 que carecen de la recombinasa pero son homocigotas para la inserción de ADN recombinante ahora modificada.

[0053] Otra estrategia para eliminar el o los casete (s) de expresión génica marcador(es) es a través de la autoescisión. Similar al enfoque de escisión anterior, una recombinasa expresada se usa para extirpar el (los) casete (s) de expresión génica marcadore(s), pero en lugar de cruzar las plantas transformadas con otra línea que expresa la recombinasa, un casete de expresión génica recombinasa se encuentra dentro de la misma constructo de ADN recombinante y está flanqueado

por las secuencias del sitio de recombinasa sitio-específica junto con el gen marcador. Los casetes de expresión que están destinados a permanecer en la planta transgénica después de la autoescisión están presentes en el constructo de ADN recombinante fuera de las secuencias del sitio de recombinasa sitio-específica. Después de la transformación y de la regeneración de la planta, se generan las plantas R_0 que contienen el constructo de ADN recombinante. Esas plantas R_0 pueden entonces ser auto-cruzadas, y las plantas de progenie R_1 resultantes pueden seleccionarse para la presencia del constructo alterada de ADN recombinante en la que se han extirpado el o los casete(s) de expresión génica marcadores y el casete de expresión de recombinasa. La ventaja de un sistema de autoescisión es que se pueden eliminar los casetes de expresión génica marcadores en menos generaciones que cuando se utiliza un sistema de escisión de recombinasa sitio-específica que requiere cruzamiento con otra línea que expresa la recombinasa sitio-específica.

[0054] Un factor de complicación para la autoescisión es encontrar elementos de expresión que proporcionen expresión de la recombinasa sitio-específica en el momento adecuado y en los tejidos correctos para la autoescisión para producir plantas de progenie R_1 sin marcadores. No todos los elementos de expresión proporcionarán un resultado exitoso para que la autoescisión se produzca de manera eficiente. Además, un elemento de expresión solo puede proporcionar una autoescisión eficiente en una especie de cultivo en particular, como el maíz, la soja o el algodón, pero no en las tres. Por lo tanto, se ha experimentado mucho para identificar a los promotores de la presente invención.

Moléculas de ADN

[0055] Tal como se lo emplea en la presente invención, el término "ADN" o "molécula de ADN" se refiere a una molécula de ADN bc de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases de desoxirribonucleótidos o una molécula de ADN. Tal como se lo emplea aquí, el término "secuencia de ADN" se refiere a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN, leída desde el extremo 5' (aguas arriba) hasta el extremo 3' (aguas abajo).

[0056] Tal como se usa en la presente invención, una "molécula de ADN recombinante" o "constructo de ADN recombinante" es una molécula o constructo de ADN, respectivamente, que comprende una combinación de secuencias de ADN que no tendrían lugar naturalmente juntas sin intervención humana. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante puede comprender al menos dos secuencias de ADN heterólogas entre sí, una secuencia de ADN que se desvía de las

secuencias de ADN que existen en la naturaleza, una secuencia de ADN sintético y/o una secuencia de ADN que ha sido incorporada al ADN genómico de una célula huésped por transformación genética, edición del genoma, o integración sitio-específica.

[0057] Tal como aquí se lo emplea, una "secuencia de nucleótidos sintéticos" o "secuencia de nucleótidos artificiales" o "secuencia de codificación sintética" es una secuencia de nucleótidos que se desconoce si tiene lugar en la naturaleza o que no sucede naturalmente. Preferentemente, las secuencias de nucleótidos sintéticos comparten poca o ninguna homología extendida con las secuencias naturales. La homología extendida en este contexto generalmente se refiere al 100% de la identidad de secuencia que se extiende más allá de aproximadamente 25 nucleótidos de secuencia contigua. Un elemento regulador de genes sintéticos de la presente invención es el intrón sintético, I-Zm.GSI85.nno:1 (SEQ ID NO:8). Una secuencia de codificación sintética, por ejemplo, es la secuencia codificante Cre-recombinasa, GOI-Cre_2 presentada como SEQ ID NO:17.

[0058] La referencia en esta solicitud a una "molécula de ADN aislada", o un término o frase equivalente, pretende significar que la molécula de ADN es una que 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, una secuencia de intrón, una secuencia no traducida, una secuencia líder, una secuencia promotora, una secuencia de terminación transcripcional y similares, que se encuentran naturalmente dentro del genoma de un organismo, no se consideran "aislados" siempre que el elemento sea nativo 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 subpartes de estos elementos, estarían "aislados" dentro del alcance de esta revelación siempre y cuando el elemento no esté dentro de su genoma nativo y / o presente en un lugar dentro del genoma donde se encuentra naturalmente. A efectos de la presente revelación, cualquier secuencia de nucleótidos transgénicos, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADN insertada en el genoma de las células de una planta o bacteria, o presente en un vector extra cromosómico, se considerará una secuencia de nucleótidos aislada tanto si está presente dentro del plásmido como en un vector similar utilizado para transformar las células, dentro del genoma de la planta o bacteria, o en cantidades detectables en tejidos, progenie, muestras biológicas o commodities derivados de la planta o bacteria.

[0059] Tal como se lo emplea en la presente invención, el término "identidad de secuencia" se refiere a la medida en que dos secuencias de polinucleótidos alineadas de manera óptima o dos secuencias de polipéptidos alineadas de manera óptima son idénticas. Una alineación óptima de secuencia para dos secuencias se crea alineando las dos secuencias, por ejemplo, una secuencia de referencia y otra secuencia, para maximizar el número de coincidencias de nucleótidos en la alineación de la secuencia con apropiadas inserciones, supresiones o brechas de nucleótidos internos. Tal como se lo emplea en la presente invención, el término "secuencia de referencia" puede referirse a una secuencia de ADN que comprende uno o más de los SEQ ID NO:1-15.

[0060] Tal como aquí se lo emplea, el término "identidad de secuencia porcentual" o "identidad porcentual" o "% de identidad" es la fracción de identidad de dos secuencias óptimamente alineadas multiplicadas por 100. La "fracción de identidad" para una secuencia alineada óptimamente con una secuencia de referencia es el número de coincidencias de nucleótidos en la alineación óptima, dividido por el número total de nucleótidos en la secuencia de referencia (es decir, el número total de nucleótidos en la longitud completa de toda la secuencia de referencia). Por lo tanto, algunas formas de realización de la presente revelación proporcionan una molécula de ADN que comprende una secuencia reguladora que, cuando se alinea de manera óptima con una secuencia de referencia, como uno de los SEQ ID NO: 1-15, tiene al menos 80 por ciento de identidad, al menos 81 por ciento de identidad, al menos 82 por ciento de identidad, al menos 83 por ciento de identidad, al menos 84 por ciento de identidad, al menos 85 por ciento de identidad, al menos 86 por ciento de identidad, al menos 87 por ciento de identidad, al menos 88 por ciento de identidad, al menos 89 por ciento de identidad, al menos 90 por ciento de identidad, al menos 91 por ciento de identidad, al menos 92 por ciento de identidad, al menos 93 por ciento de identidad, al menos 94 por ciento de identidad, al menos 95 por ciento de identidad, al menos 96 por ciento de identidad, al menos 97 por ciento de identidad, al menos 98 por ciento de identidad, al menos 99 por ciento de identidad, o 100 por ciento de identidad con respecto a la secuencia de referencia. De acuerdo con las formas de realización actuales, la secuencia reguladora puede estar vinculada operativamente a una secuencia de ADN transcripta, que puede codificar una recombinasa sitio-específica.

Elementos reguladores

[0061] Los elementos reguladores, como promotores, líderes (también conocidos como 5' UTRs), potenciadores, intrones y regiones de terminación de transcripción (o 3' UTRs), juegan un papel integral en la expresión general de genes en células vivas. El término "elemento regulador", tal como se lo emplea en la presente invención, se refiere a una molécula de ADN o a una secuencia o segmento de ADN que tiene actividad reguladora de genes. El término "actividad reguladora de genes", tal como se lo emplea en la presente invención, se refiere a la capacidad de afectar la expresión de una molécula de ADN transcribible vinculada operativamente, por ejemplo, al afectar la transcripción y / o traducción de la molécula de ADN transcribible operativamente vinculada. 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 a través de la ingeniería genética. De acuerdo con las formas de realización de la presente revelación, un elemento regulatorio es un promotor que tiene una secuencia que comprende los SEQ ID NO: 2, 7 u 11, o una secuencia que tiene al menos 80 por ciento de identidad, al menos 81 por ciento de identidad, al menos 82 por ciento de identidad, al menos 83 por ciento de identidad, al menos 84 por ciento de identidad, al menos 85 por ciento de identidad, al menos 86 por ciento de identidad, al menos 87 por ciento de identidad, al menos 88 por ciento de identidad, al menos 89 por ciento de identidad, al menos 90 por ciento de identidad, al menos 91 por ciento de identidad, al menos 92 por ciento de identidad, al menos 93 por ciento de identidad, al menos 94 por ciento de identidad, al menos 95 por ciento de identidad, al menos 96 por ciento de identidad, al menos 97 por ciento de identidad, al menos 98 por ciento de identidad, al menos 99 por ciento de identidad, o 100 por ciento de identidad con respecto a los SEQ ID NO: 2, 7 u 11, o un fragmento o porción funcional de cualquiera de las secuencias anteriores. De acuerdo con las formas de realización de la presente revelación, un elemento regulatorio es un líder que tiene una secuencia que comprende los SEQ ID NO: 3, 12, o el líder comprendido dentro del SEQ ID NO: 7, o una secuencia que tiene al menos 80 por ciento de identidad, al menos 81 por ciento de identidad, al menos 82 por ciento de identidad, al menos 83 por ciento de identidad, al menos 84 por ciento de identidad, al menos 85 por ciento identidad, al menos 8 6 por ciento identidad, al menos 87 por ciento identidad, al menos 88 por ciento identidad, al menos 89 por ciento identidad, al menos 90 por ciento identidad, al menos 91 por ciento identidad, al menos 92 por ciento identidad, al menos 93 por ciento identidad, al menos 94 por ciento identidad, al menos 95 por ciento identidad, al menos 96 por

ciento de identidad, al menos 97 por ciento de identidad, al menos 98 por ciento de identidad, al menos 99 por ciento de identidad o 100 por ciento de identidad con respecto a SEQ ID NO: 3, 12, o el líder comprendido dentro del SEQ ID NO: 7, o un fragmento o porción funcional de cualquiera de las secuencias anteriores que pueden afectar la expresión de una secuencia de ADN transcribible operativamente vinculada.

[0062] Tal como se lo emplea en la presente invención, un "fragmento" de un promotor (o secuencia promotora) o elemento regulador comprende un fragmento o porción del promotor (o secuencia promotora) o elemento regulador, respectivamente, y un "fragmento funcional" de un promotor (o secuencia promotora) o elemento regulador comprende un fragmento o porción del promotor (o secuencia promotora) o elemento regulador, respectivamente, que afecta, modula o impulsa la expresión de una secuencia de ADN transcribible vinculada operativamente. Según algunas formas de realización, un "fragmento funcional" de un promotor (o secuencia promotora) o elemento regulador afecta, modula o secunda la expresión de una secuencia de ADN transcribible operativamente ligada de manera similar al promotor (o secuencia promotora) o elemento regulador.

[0063] Tal como aquí se lo emplea, un "grupo de elementos de expresión reguladora" o una secuencia "EXP" se refiere a un grupo de dos o más elementos reguladores vinculados operativamente, como potenciadores, promotores, líderes e intrones. Tales dos o más elementos reguladores vinculados operativamente pueden estar normalmente presentes juntos en el mismo constructo y cada uno de ellos vinculado operativamente a una secuencia de ADN transcripto. Por ejemplo, un grupo de elementos de expresión reguladora puede estar compuesto, por ejemplo, por un promotor vinculado operativamente 5' a una secuencia líder. Los EXP útiles en la práctica de las formas actuales de realización pueden comprender los SEQ ID NO: 1, 6 o 10, y secuencias que tengan al menos 8 0 por ciento de identidad, al menos 81 por ciento de identidad, al menos 82 por ciento de identidad, al menos 83 por ciento de identidad, al menos 84 por ciento de identidad, al menos 85 por ciento de identidad, al menos 86 por ciento de identidad, al menos 87 por ciento de identidad, al menos 88 por ciento de identidad, al menos 89 por ciento de identidad, al menos 90 por ciento de identidad, al menos 91 por ciento de identidad, al menos 92 por ciento de identidad, al menos 93 por ciento de identidad, al menos 94 por ciento de identidad, al menos 95 por ciento de identidad, al menos 96 por ciento de identidad, al menos 97 por ciento de identidad, al menos

98 por ciento de identidad, al menos 99 por ciento de identidad o 100 por ciento de identidad con respecto a los SEQ ID NO: 1, 6 o 10.

[0064] Los elementos reguladores pueden caracterizarse por su patrón de expresión génica asociado en plantas, tejidos vegetales y células vegetales, por ejemplo, por sus efectos positivos y/o negativos sobre la expresión, tales como la expresión constitutiva o patrones específicos de expresión, como la expresión temporal, espacial, de desarrollo, tisular, ambiental, fisiológica, patológica o del ciclo celular, y/o la expresión químicamente sensible o inducible, y cualquier combinación de los mismos, así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas o patrones de expresión. Tal como aquí se lo emplea, un "patrón de expresión génica" es cualquier patrón de transcripción de una molécula de ADN vinculada operativamente en una molécula de ARN transcripta que resulta en niveles relativos y abundancia de la molécula de ARN transcripta en varios tejidos y células vegetales durante el desarrollo. Los elementos reguladores pueden comprender un potenciador, un promotor, un líder, una región 5' UTR, un intrón y/o una región 3' UTR.

[0065] Tal como se lo emplea en la presente invención, el término "promotor" se refiere generalmente a una molécula, segmento o secuencia de ADN que están involucrados en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa II y otras proteínas, como los factores de transcripción de acción trans, para iniciar o regular la transcripción. Un promotor puede aislarse inicialmente de una región ascendente o región 5' no traducida (5' UTR) de una copia genómica de un gen. Alternativamente, los promotores pueden ser moléculas de ADN producidas sintéticamente o modificadas. Los promotores también pueden ser quiméricos. Los promotores quiméricos se producen a través de la fusión de dos o más moléculas heterólogas de ADN. Los promotores útiles en la práctica de las formas de realización actuales pueden incluir elementos promotores que comprenden los SEQ ID NO: 2, 7 u 11, o una secuencia dentro de cualquiera de los SEQ ID NO: 1, 6 y 10, o una secuencia que tenga al menos 80 por ciento de identidad, al menos 81 por ciento de identidad, al menos 82 por ciento de identidad, al menos 83 por ciento de identidad, al menos 84 por ciento de identidad, al menos 85 por ciento de identidad, al menos 86 por ciento de identidad, al menos 87 por ciento de identidad, al menos 88 por ciento de identidad, al menos 89 por ciento de identidad, al menos 90 por ciento de identidad, al menos 91 por ciento de identidad, al menos 92 por ciento de identidad, al menos 93 por ciento de identidad, al menos 94 por ciento de identidad, al menos 95 por ciento de identidad , al menos 96 por ciento de

identidad, al menos 97 por ciento de identidad, al menos 98 por ciento de identidad, al menos 99 por ciento de identidad, o 100 por ciento de identidad con respecto a los SEQ ID NO: 2, 7 u 11, o una secuencia que tenga al menos 80 por ciento de identidad, al menos 81 por ciento de identidad, al menos 82 por ciento de identidad, al menos 83 por ciento de identidad, al menos 84 por ciento de identidad, al menos 85 por ciento de identidad, al menos 86 por ciento de identidad, al menos 87 por ciento de identidad, al menos 88 por ciento de identidad, al menos 89 por ciento de identidad, al menos 90 por ciento de identidad, al menos 91 por ciento de identidad, al menos 92 por ciento de identidad, al menos 93 por ciento de identidad, al menos 94 por ciento de identidad, al menos 95 por ciento de identidad, al menos 96 por ciento de identidad, al menos 97 por ciento de identidad, al menos 98 por ciento de identidad, al menos 99 por ciento de identidad, o 100 por ciento de identidad con respecto a una secuencia dentro de cualquiera de los SEQ ID NO: 1, 6 y 10, o un fragmento funcional o porción de cualquiera de las secuencias antes mencionadas. En formas específicas de realización, las moléculas de ADN y cualquier variante, fragmento, porción o derivado de las mismas como se describe en la presente invención, se definen además como que comprenden la actividad promotora, es decir, son capaces de actuar como promotoras en una célula huésped, como en una planta transgénica. En formas de realización aún más específicas, un fragmento de una secuenciación promotora se puede definir como la actividad promotora exhibidora poseída por la molécula promotora inicial de la que se 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 ARN polimerasa II para el inicio de la transcripción.

[0066] En una forma de realización, se proveen fragmentos de una secuencia promotora divulgada en este documento. Los fragmentos promotores pueden comprender la actividad del promotor, como se describió anteriormente, y pueden ser útiles solos o en combinación con otros promotores y/o fragmentos promotores, como en el constructo de promotores quiméricos, o en combinación con otros elementos de expresión o reguladores y fragmentos de elementos de expresión o reguladores. En formas específicas de realización, se proveen fragmentos de un promotor que comprenden al menos alrededor de 50, al menos alrededor de 75, al menos alrededor de 95, al menos alrededor de 100, al menos alrededor de 125, al menos alrededor de 150, al menos alrededor de 175, al menos alrededor de 200, al menos alrededor de 225, al menos alrededor de 250, al menos alrededor de 275, al menos alrededor de 300, al menos alrededor de 500, al menos alrededor de

600, al menos alrededor de 700, al menos alrededor de 750, al menos alrededor de 800, al menos alrededor de 900, o al menos alrededor de 1000 nucleótidos contiguos, o más, de un promotor, secuencia de promotores o molécula de ADN que tenga actividad promotora como se describe en el presente documento.

[0067] Las moléculas o constructos de ADN recombinante que comprenden un elemento promotor o regulador derivado de cualquiera de los elementos promotores proporcionados como los SEQ ID NO: 2, 7 y 11, o de cualquier secuencia dentro de cualquiera de los SEQ ID NO: 1, 6 y 10, como secuencias internas o truncadas o secuencias con eliminaciones 5', por ejemplo, pueden producirse utilizando métodos conocidos en la técnica para modificar o alterar la expresión, por ejemplo, eliminando elementos o porciones de elementos o secuencias espaciadoras no funcionales, que pueden tener efectos positivos o negativos en la expresión; duplicando elementos que tienen efectos positivos o negativos en la expresión; insertando elementos que tienen efectos positivos o negativos en la expresión; y / o duplicando o eliminando elementos que tienen efectos específicos del tejido, desarrollo o células específicas en la expresión. Se puede utilizar cualquier constructo o molécula de ADN recombinante que comprenda un promotor o elemento regulador derivado de cualquiera de los elementos promotores proporcionados como los SEQ ID NO : 2, 7 u 11, o de cualquier secuencia dentro de los SEQ ID NO: 1, 6 o 10, que comprenden supresiones 3' en las que se elimine el elemento caja TATA o la secuencia equivalente del mismo y la secuencia posterior, por ejemplo, para hacer elementos potenciadores. Se pueden hacer supresiones adicionales para eliminar cualquier elemento que tengan efectos positivo o negativo; específicos del tejido; específicos de la célula; o específicos del tiempo (como, entre otros, el ritmo circadiano o el momento del desarrollo) con respecto a la expresión. Cualquiera de los elementos promotores proporcionados como los SEQ ID NO: 2, 7 y 11, o comprendidos dentro de cualquiera de los SEQ ID NO: 1, 6 y 10, y fragmentos o potenciadores derivados de los mismos, se pueden usar para hacer composiciones de elementos reguladores transcripcionales quiméricos.

[0068] De acuerdo con la invención, un promotor o fragmento promotor puede ser analizado para la presencia de elementos promotores conocidos, es decir, características de la secuencia de ADN, tales como una caja TATA y otros motivos conocidos del sitio de unión al factor de transcripción. La identificación de tales elementos promotores conocidos puede ser utilizada por un experto en la técnica para diseñar variantes del promotor que posean un patrón de expresión similar al promotor original.

[0069] Tal como se lo emplea en la presente invención, el término "líder" se refiere a una molécula de ADN aislada de la región 5' no traducida (5' UTR) un gen y definida 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 proteínas. Alternativamente, los líderes pueden ser elementos de ADN producidos o diseñados sintéticamente. Un líder puede usarse como un elemento regulador de 5' para modular la expresión de una secuencia de ADN transcribible operativamente vinculada. Las secuencias líderes se pueden usar con un promotor heterólogo o con su promotor nativo. Los líderes útiles en la práctica de las formas actuales de realización pueden incluir los SEQ ID NO: 3, 12, o el líder comprendido dentro del SEQ ID NO: 7, o una secuencia que tenga al menos 80 por ciento de identidad, al menos 81 por ciento de identidad, al menos 82 por ciento de identidad, al menos 83 por ciento de identidad, al menos 84 por ciento de identidad, al menos 85 por ciento de identidad, al menos 86 por ciento de identidad, al menos 87 por ciento de identidad, al menos 88 por ciento de identidad, al menos 89 por ciento de identidad, al menos 90 por ciento de identidad, al menos 91 por ciento de identidad, al menos 92 por ciento de identidad, al menos 93 por ciento de identidad y, al menos 94 por ciento de identidad, al menos 95 por ciento de identidad, al menos 96 por ciento de identidad, al menos 97 por ciento de identidad, al menos 98 por ciento de identidad, al menos 99 por ciento de identidad, o 100 por ciento de identidad con respecto a los SEQ ID NO: 3, 12, o el líder comprendido con el SEQ ID NO: 7, o un fragmento funcional o porción de cualquiera de las secuencias anteriores; o cualquiera de los elementos líderes comprendidos en cualquiera de los NO de SEQ ID: 1, 6 y 10, o dentro de cualquier secuencia que tenga al menos 80 por ciento de identidad, al menos 81 por ciento de identidad, al menos 82 por ciento de identidad, al menos 83 por ciento de identidad, al menos 84 por ciento de identidad, al menos 85 por ciento de identidad, al menos 86 por ciento de identidad, al menos 87 por ciento de identidad, al menos 88 por ciento de identidad, al menos 89 por ciento de identidad, al menos 90 por ciento de identidad, al menos 91 por ciento de identidad, al menos 92 por ciento de identidad, al menos 93 por ciento de identidad, al menos 94 por ciento de identidad, al menos 95 por ciento de identidad, al menos 96 por ciento de identidad, al menos 97 por ciento de identidad, al menos 98 por ciento de identidad, al menos 99 por ciento de identidad, o 100 por ciento de identidad con respecto a los SEQ ID NO: 1, 6 o 10, o fragmentos funcionales o partes de los mismos. En formas específicas de realización, tales secuencias de ADN pueden definirse como capaces de actuar como

un líder en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo, una célula vegetal transgénica. En una forma de realización, tales secuencias se definen como la actividad del líder.

[0070] Las secuencias de líderes (también denominadas UTR de 5' presentadas) se presentan como los SEQ ID NO: 3, 12, o el líder comprendido dentro del SEQ ID NO: 7; o cualquiera de los elementos principales comprendidos en cualquiera de los SEQ ID NO:1, 6 y 10 puede estar compuesto por elementos reguladores, y/o puede adoptar estructuras secundarias que pueden modular o tener un efecto sobre la transcripción o traducción de una secuencia de ADN transcribible operativamente vinculada. Las secuencias de líderes presentadas como los SEQ ID NO: 3, 12, o el líder comprendido dentro del SEQ ID NO: 7 o cualquier fragmento del mismo, o cualquiera de los elementos líderes comprendidos dentro de cualquiera de los SEQ ID NO: 1, 6 y 10 o cualquier fragmento de los mismos, se pueden usar de acuerdo con esta revelación para hacer elementos reguladores quiméricos que afecten la transcripción o traducción de una secuencia de ADN transcribible operativamente vinculada.

[0071] Tal como se lo emplea en la presente invención, el término "intrón" se refiere a una molécula o secuencia de ADN que puede aislarse o identificarse a partir de un gen y puede definirse generalmente como una región empalmada durante el procesamiento del ARN mensajero (ARNm) antes de la traducción. Alternativamente, un intrón puede ser un elemento de ADN producido sintéticamente o diseñado. Un intrón puede contener elementos potenciadores que afectan la transcripción de genes vinculados operativamente o secuencias de ADN transcriptas. Un intrón puede utilizarse como elemento regulador para modular la expresión de una secuencia de ADN transcribible operativamente enlazada. Un constructo puede comprender un intrón, y el intrón puede o no ser heterólogo con respecto a la secuencia de ADN transcripto. Como ejemplos de intrones en la técnica se pueden citar al intrón de actina de arroz y al intrón HSP70 de maíz.

[0072] En las plantas, la inclusión de algunos intrones en los constructos de genes conduce a un aumento del ARNm y a la acumulación de proteína 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 conocidos por estimular la expresión en plantas en genes de maíz (por ejemplo, tubA1, Adh1, Sh1, a y Ubi1), en genes de arroz (por ejemplo, tpi) y en genes de plantas dicotiledóneas como los de las petunias (por ejemplo, rbcS), papa (por ejemplo, st-ls1) y de *Arabidopsis thaliana* (por ejemplo, ubq3 y pat1). Se ha demostrado que las supresiones o

mutaciones dentro de los sitios de empalme de un intrón reducen la expresión génica, lo que indica que el empalme podría ser necesario para la IME. Sin embargo, la IME en plantas dicotiledóneas se ha demostrado por mutaciones puntuales dentro de los sitios de empalme del gen pat1 de A. *thaliana.* Se ha demostrado que múltiples usos del mismo intrón en una planta presentan desventajas. En esos casos, es necesario contar con una colección de elementos de control básicos para el constructo de elementos de ADN recombinantes apropiados. Los intrones ejemplares útiles en la práctica de la presente invención se presentan como los SEQ ID NO: 4, 8 y 13.

[0073] Tal como se usan en la presente invención, los términos "secuencia de terminación de transcripción 3'", "región 3' no traducida" o "3' UTR" se refieren a una secuencia de ADN que se transcribe en la región no traducida dentro de la porción 3' de un molécula de ARNm (ARN mensajero) como generalmente se entiende en la técnica. La región 3' no traducida de una molécula de ARNm puede ser generada por escisión específica y poliadenilación 3', también conocida como formación de una cola de poliA. La UTR 3' puede estar vinculada operativamente y localizada por debajo de una porción codificadora de ARN o proteína de una secuencia de ADN transcribible y puede incluir una señal de poliadenilación y otros elementos reguladores o señales capaces de afectar la transcripción, el procesamiento del ARNm y / o la expresión génica. Se cree que las colas de poliA funcionan en la estabilidad del ARNm y en la iniciación de la traducción. Como ejemplos de moléculas de terminación de transcripción 3' en la técnica se pueden citar la región de la nopalina sintasa 3', la región hsp17 3' del trigo, la región de la subunidad 3' pequeña del guisante rubisco, la región E6 3' del algodón y la región 3' UTR de coixin.

[0074] Las regiones 3' UTR normalmente encuentran un uso beneficioso para la expresión recombinante de moléculas específicas de ADN. Una región 3' UTR débil tiene el potencial de generar lectura, lo que puede afectar la expresión de la molécula de ADN ubicada en los casetes de expresión vecinos. El control de la terminación de la transcripción puede evitar la lectura de secuencias de ADN (por ejemplo, otros casetes de expresión) localizadas más abajo y puede 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 el reinicio de la transcripción y, por lo tanto, afecta directamente el nivel general de transcripción. Después de la terminación de la transcripción, el ARNm maduro queda liberado del sitio de síntesis y es transportado al citoplasma. Los ARNm eucariotas se acumulan como formas poli(A) *in vivo*, lo que dificulta la detección de sitios de terminación transcripcional

por los métodos convencionales. Sin embargo, la predicción de regiones 3' UTR funcionales y eficientes por métodos bioinformáticos es difícil ya que no hay secuencias de ADN conservadas que permitan una fácil predicción de una región 3' UTR efectiva.

[0075] La regulación de la función génica a través de regiones 3' UTR es un campo relativamente nuevo, ya que solo la reciente tecnología de secuenciación nos ha proporcionado el panorama completo de las regiones 3' UTR en todas las especies y tipos de células. Antes de que la tecnología de secuenciación estuviera disponible, los estudios funcionales y mecanicistas detallados se realizaban sólo en unos pocos modelos 3' UTR. Aunque estos modelos 3' UTR han contribuido sustancialmente a nuestra comprensión de la biología 3' UTR, las conclusiones extraídas sobre sus funciones reguladoras han sido limitadas y se han centrado más en la estabilidad del ARNm. (Mayr, Christine (2017) *Regulation by 3'-Unstranslated Regions.* Annual Review of Genetics, 51: 171-194) Un análisis *in silico* (via simulación computacional) de todo el genoma reveló que los motivos en la 3' UTR se conservan principalmente en una cadena, siendo así 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 regiones 3' UTR determinan los niveles de proteína a través de la regulación de la estabilidad y traducción del ARNm mediada en gran medida por elementos ricos en AU y miARN. Las 3' UTR también permiten la traducción local a través de la regulación de la localización del ARNm. La longitud de una UTR de 3' puede regularse mediante la escisión alternativa y la poliadenilación. Las 3' UTR median las interacciones proteína-proteína (PPI, según las siglas en inglés) que tienen consecuencias generalizadas para la formación de complejos proteicos, la localización de proteínas y la función de las proteínas. Las 3' UTR regulan la expresión génica a través de la unión de las proteínas de unión al ARN (RBP, según las siglas en inglés). Las proteínas RBP se unen a los elementos-*cis* en las regiones 3' UTR y median las funciones de 3' UTR a través del reclutamiento de proteínas efectoras. Las RBP cooperan con otras RBP enlazadas 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 de acuerdo con el entorno local, por ejemplo, mediante la adición de modificaciones postraduccionales, la expresión local de otras proteínas RBP y las interacciones con membranas y filamentos citoesqueléticos. La unión a las proteínas RBP también está influenciada por la formación de estructuras de ARN secundario y

terciario que regula la accesibilidad de regiones 3' UTR (Mayr, Christine (2017) *Regulation by 3'-Untranslated Regions.* Annual Review of Genetics, 51: 171-194).

[0076] La cola poli(A) resulta del agregado 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 regulares, llamados proteínas de unión a poli(A) (PABP, según las siglas en inglés) que tienen funciones en la regulación de la expresión génica, incluida la exportación, estabilidad y descomposición del ARNm, y la traducción. La estructura 5' cap del ARNm y la cola poli-A funcionan sinérgicamente para controlar la traducción del ARNm. La asociación de las poteínas PABP con la cola poli(A) facilita una interacción con eIF4F unida a la estructura 5'cap, lo que resulta en la circularización del ARNm que promueve el inicio de la traducción y asegura el reciclaje de ribosomas y la traducción eficiente. Esta interacción también permite la inhibición de la traducción por proteínas inhibidoras unidas a la región 3' UTR (Barret, L et. al. (2012) *Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated regions and other non-coding elements.* Cell. Mol. 69:3613-3634).

[0077] Desde un punto de vista práctico, suele ser beneficioso que una región 3' UTR utilizada en un casete de expresión posea las siguientes características. En primer lugar, la 3' UTR debe ser capaz de terminar de manera eficiente y efectiva la transcripción del transgén y evitar la lectura de la transcripción en cualquier secuencia de ADN vecina, que puede estar compuesta por otro casete de expresión como en el caso de los múltiples casetes de expresión que residen en un constructo, o el ADN cromosómico vecino donde se ha insertado el constructo. En segundo lugar, la 3' UTR no debe causar una reducción en la actividad transcripcional impartida por el promotor, líder, los potenciadores e intrones que se utilizan para impulsar la expresión de la secuencia de ADN. Finalmente, en la biotecnología vegetal, a menudo se utiliza la 3' UTR para la iniciación de las reacciones de amplificación del ARN transcripto inverso extraído de la planta transformada y se se emplea 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 utiliza en reacciones de amplificación del ADN extraído de la planta transformada para caracterizar la integridad del casete insertado. Las regiones 3' UTR útiles en la práctica de la presente invención se presentan como los SEQ ID NO:5, 9, 14, y 15.

[0078] Tal como aquí se lo emplea, el término "quimérico" se refiere a una sola molécula de ADN producida al fusionar 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 con 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 aquí se lo emplea, el término "promotor quimérico" se refiere a un promotor producido a través de dicha manipulación de moléculas de ADN. Un promotor quimérico puede combinar dos o más fragmentos de ADN, por ejemplo, la fusión de un promotor a un elemento potenciador. Por lo tanto, el diseño, el constructo y el uso de promotores quiméricos de acuerdo con los métodos descriptos en este documento para modular la expresión de moléculas de ADN transcribibles operativamente unidas quedan comprendidos por la presente invención.

[0079] Los elementos reguladores quiméricos pueden diseñarse para comprender diversos elementos constituyentes que pueden estar vinculados operativamente por diversos métodos conocidos en la técnica, como digestión y ligadura de enzimas de restricción, la clonación independiente de la ligadura, el ensamblaje modular de productos de PCR durante la amplificación o la 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 constituyentes, o variantes de los mismos, pero difieren en la secuencia de ADN o en las secuencias de ADN que componen la secuencia de ADN de enlace o secuencias que permiten que las partes constituyentes se unan operativamente. En la invención, las secuencias de ADN proporcionadas como los SEQ ID NO:1-15 pueden proporcionar secuencias de referencia de elementos reguladores, donde los elementos constituyentes que componen la secuencia de referencia pueden unirse mediante métodos conocidos en la técnica y pueden comprender sustituciones, supresiones y/o inserciones de uno o más nucleótidos o mutaciones que tienen lugar naturalmente en la transformación de células bacterianas y vegetales.

[0080] Tal como se lo emplea en la presente invención, el término "variante" se refiere a una segunda molécula de ADN, como elemento regulador, que es en composición similar, pero no idéntica, a una primera molécula de ADN, y donde la segunda molécula de ADN aún mantiene la funcionalidad general, es decir, el mismo patrón de expresión 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, como una con diferentes sitios de enzimas de restricción y/o supresiones, sustituciones o inserciones internas. Una "variante" también puede abarcar un elemento regulador que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, supresión o inserción de uno o más nucleótidos de una secuencia de referencia, en la que el elemento regulador derivado tiene una actividad transcripcional o traslacional más o menos o equivalente a la molécula reguladora original correspondiente. Las "variantes" del elemento regulador también abarcarán las variantes que surjan de mutaciones que tengan lugar naturalmente en la transformación de células bacterianas y vegetales. En la presente invención, una secuencia de polinucleótidos proporcionada como los SEQ ID NO:1-15 puede ser utilizada para crear variantes que son similares en composición, pero no idénticas, a la secuencia de ADN del elemento regulador original, manteniendo la funcionalidad general, es decir, el mismo patrón o un patrón similar de expresión, del elemento regulador original. La producción de dichas variantes de la invención está bien relacionada con los conocimientos comunes de la técnica, a la luz de la revelación, y está incluida dentro del alcance de la invención.

[0081] Tal como aquí se lo emplea, una "secuencia de ADN transcribible" es cualquier secuencia de ADN que, cuando se vincula operativamente a un promotor, puede transcribirse en ARN. La molécula de ARN transcripta codificada por la secuencia de ADN transcribible vinculada operativamente al elemento o a los elementos reguladores proporcionados en este documento puede traducirse para producir una molécula de proteína o puede proporcionar un antisentido u otra molécula de ARN funcional o reguladora, como un ARN de horquilla bicatenaria (ARNbc), un ARN de transferencia (ARNt), un ARN ribosómico (ARNr), un microARN (miARN), un pequeño ARN interferente (siARN), y similares.

[0082] Tal como aquí se lo emplea, el término "expresión de proteínas" es cualquier patrón de traducción de una molécula de ARN transcripta en una molécula de proteína. La expresión de proteínas puede caracterizarse por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo o morfológicas, así como por sus indicaciones cuantitativas o cualitativas o patrones de expresión.

[0083] La eficacia de las modificaciones, duplicaciones o supresiones descriptas en este documento sobre los aspectos de expresión deseados de un transgén particular puede probarse empíricamente en ensayos de plantas estables y transitorias, como los descriptos en los ejemplos

de trabajo en este documento, para obtener los resultados, que pueden variar según los cambios realizados y el objetivo del cambio en la molécula de ADN inicial.

Constructos

[0084] Tal como se lo emplea en la presente invención, el término "constructo" significa cualquier molécula o vector de ADN, o un segmento o porción de una molécula de ADN, vector o cromosoma, derivado de una o más fuentes y capaz de transfección o integración genómica, que comprende al menos dos secuencias de ADN unidas entre sí de una manera funcionalmente operativa. Por ejemplo, un constructo puede comprender dos secuencias operativamente alineadas, como un elemento regulador o un promotor vinculado operativamente a una secuencia codificante o secuencia de ADN transcribible. Un constructo puede ser un constructo de ADN recombinante. Un ejemplo de un constructo que es un segmento de ADN lineal y recombinante es un ADN-T. A Tal como se lo emplea en la presente invención, un "vector" se refiere a una molécula de ADN que puede contener o comprender un constructo de la presente revelación, como ser, por ejemplo, un plásmido, cósmido, virus, fago u otra molécula de ADN lineal o circular, y un "vector de transformación de ADN" significa cualquier molécula de ADN o vector que comprende un constructo de ADN recombinante que puede usarse con fines de transformación, es decir, para la introducción de una molécula o constructo de ADN recombinante en una célula huésped, como una célula vegetal. De acuerdo con algunas formas de realización, un vector de formación de ADN puede comprender un segmento de ADN-T limitado por secuencias de borde izquierdo y/o derecho, que puede usarse para la transformación mediada por bacterias, como la transformación mediada por *Rhizobium* o *Agrobacterium*. Un constructo normalmente incluye uno o más casetes de expresión, una secuencia codificante de genes o una secuencia de ADN transcribible vinculada operativamente a una o más secuencias reguladoras, como un promotor, etc. Tal como se lo emplea en la presente invención, un "casete de expresión" se refiere a una secuencia de ADN que comprende al menos una secuencia de ADN transcribible vinculada operativamente a uno o más elementos reguladores, normalmente al menos un promotor y una región 3' UTR.

[0085] Tal como se lo emplea en la presente invención, el término "vinculada/o operativamente" se refiere a una relación funcional entre dos o más secuencias de ADN unidas físicamente de una molécula de ADN, constructo, vector o cromosoma que comprende una primera y segunda secuencia de ADN dispuestas de tal manera que la primera secuencia de ADN afecta la función o

expresión de la segunda secuencia de ADN. Las dos secuencias de ADN pueden o no ser parte de una sola molécula de ADN contigua y pueden o no ser adyacentes. Por ejemplo, un promotor está vinculado operativamente a una secuencia de ADN transcribible si el promotor modula la transcripción de la secuencia de ADN transcribible de interés en una célula. Un líder, por ejemplo, está vinculado operativamente a una secuencia de ADN transcribible cuando es capaz de afectar a la transcripción o traducción de la secuencia de ADN.

[0086] Los constructos de la invención pueden proporcionarse, en una forma de realización, como constructos de borde plásmido inductor de tumores dobles (Ti) que tienen las regiones borde derecho (RB o AGRtu.RB, según las siglas en inglés) y borde izquierdo (LB o AGRtu.LB, según las siglas en inglés) del plásmido Ti o Ri aislado de *Agrobacterium spp.* (por ejemplo, A. *tumefaciens* o *A. rhizogenes*) que comprende un ADN-T que, junto con las móleculas de transferencia proporcionados por las células de *Agrobacterium*, permiten la integración del ADN-T en el genoma de una célula vegetal (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 6,603,061). Las constructos también pueden contener los segmentos de ADN de la columna vertebral del plásmido que proporcionan la función de replicación y una selección antibiótica en células bacterianas, por ejemplo, un origen de replicación de *Escherichia coli* tal como ori 322, un amplio origen de replicación de rango de huéspedes como oriV u oriRi (véase, por ejemplo, Ye et al., Transgenic Research 20 (4): 773-86, 2011), y una región codificante para un marcador seleccionable como Spec/Strp que codifica para la aminoglucósido adeniltransferasa Tn7 (*aadA*) que confiere resistencia a la espectinomicina o la estreptomicina, o un gen marcador seleccionable de gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación de plantas, la cepa bacterial huésped es a menudo *A. tumefaciens* ABI, C58 o LBA4404, sin embargo, otras cepas conocidas por los expertos en la técnica de la transformación vegetal pueden funcionar en la invención.

[0087] En la técnica se conocen los métodos para ensamblar e introducir constructos en una célula en un nivel tal que la molécula de ADN transcribible se transcriba en una molécula de ARNm funcional que se traduce y expresa como una proteína. Para la práctica de la invención, las composiciones convencionales y los métodos para preparar y utilizar constructos y cápsulas huésped son bien conocidos por los expertos en la materia. 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.

[0088] Se pueden incluir varios elementos reguladores en un constructo, entre ellos cualquiera de los aquí previstos. Cualquiera de estos elementos reglamentarios podrá proporcionarse en combinación con otros elementos reglamentarios. Tales combinaciones pueden diseñarse o modificarse para producir características regulatorias deseables. En una forma de realización, los constructos de la invención comprenden al menos un elemento regulador vinculado operativamente a una molécula de ADN transcribible vinculada operativamente a una 3' UTR.

[0089] Los constructos de la invención pueden incluir cualquier promotor o líder provisto en este documento o conocido en la técnica. Por ejemplo, un promotor de la invención puede estar vinculado operativamente a un líder heterólogo 5' no traducido como por ejemplo uno derivado de un gen de proteína de choque térmico. Alternativamente, un líder de la invención puede estar vinculado a un promotor heterólogo como el promotor de transcripción 35S del virus mosaico de la coliflor.

[0090] Los casetes de expresión también pueden incluir una secuencia codificante de péptidos de tránsito que codifica un péptido que es útil para la orientación subcelular de una proteína operativamente ligada, particularmente a un cloroplasto, leucoplasto u otro orgánulo plastidio; mitocondrias; peroxisoma; vacuola; o una ubicación extracelular. Muchas proteínas localizadas en cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se dirigen al cloroplasto mediante un péptido de tránsito de cloroplasto (CTP, según las siglas en inglés). Ejemplos de tales proteínas aisladas de cloroplasto incluyen, pero no se limitan a, aquellas asociadas con la subunidad pequeña (SSU, según las siglas en inglés) de ribulosa–1,5,–bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, el complejo recolector de luz proteína I y proteína II, tiorredoxina F y enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS, según las siglas en inglés). Los péptidos de tránsito del cloroplasto se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense No. 7.193.133. Se ha demostrado que las proteínas no cloroplasto pueden dirigirse al cloroplasto mediante la expresión de un CTP heterólogo vinculado operativamente al transgén que codifica una proteína no cloroplasto.

Secuencias de ADN transcribibles

[0091] Tal como se lo emplea en la presente invención, el término "secuencia de ADN transcribible" se refiere a cualquier secuencia de ADN capaz de transcribirse en una molécula de ARN, incluidas, 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 secuencia de ADN puede incluir, pero no se limita a, una secuencia de ADN de la misma planta, una secuencia de ADN de otra planta, una secuencia de ADN de un organismo diferente, o una secuencia de ADN sintética, como una secuencia de ADN que contiene un mensaje antisentido de un gen, o una secuencia de ADN que codifica una versión artificial, sintética o modificada de algún otro modo de un transgén. Las secuencias de ADN transcribibles ejemplares para su incorporación en los constructos de la invención incluyen, por ejemplo, secuencias de ADN o genes de una especie distinta de la especie en la que se incorpora la secuencia de ADN o genes que se originan o están presentes en la misma especie, pero que se incorporan a las células receptoras mediante métodos de ingeniería genética en lugar de técnicas clásicas de mejoramiento.

[0092] Un "transgén" se refiere a una secuencia 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 secuencia de ADN transcribible incorporada artificialmente en el genoma de una célula huésped en la generación actual o anterior de la célula.

[0093] Un elemento regulador, tal como un promotor de la invención, puede estar vinculado operativamente a una secuencia de ADN transcripta que es heteróloga con respecto al elemento regulador. Tal como se lo emplea en la presente invención, el término "heterólogo" se refiere a la combinación de dos o más secuencias de ADN cuando dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, las dos secuencias de ADN pueden haber sido derivadas de diferentes especies y/o las dos secuencias de ADN pueden haber sido derivadas de diferentes genes, por ejemplo, de diferentes genes de la misma especie o los mismos genes de diferentes especies. Un elemento regulador es, por lo tanto, heterólogo con respecto a una secuencia de ADN transcribible operativamente ligada en tanto tal combinación no se encuentre normalmente en la naturaleza, es decir, la secuencia de ADN transcribible no tiene lugar naturalmente vinculada operativamente al elemento regulador. Por "secuencia de ADN transcribible heteróloga", se entiende que la secuencia de ADN transcribible es heteróloga con respecto a la secuencia de polinucleótidos a la que está vinculada operativamente.

[0094] La secuencia de ADN transcribible generalmente puede ser cualquier secuencia de ADN para la cual se desea la expresión de una transcripción. Tal expresión de una transcripción puede resultar en la traducción de la molécula de ARNm resultante y, por lo tanto, en la expresión de

proteínas. Alternativamente, por ejemplo, una secuencia de ADN transcribible puede diseñarse para causar en última instancia una disminución de la expresión de un gen o proteína específica. En una forma de realización, esto se puede lograr mediante el uso de una secuencia de ADN transcribible que está orientada en la dirección de la hormiga. Cualquier conocedor de la técnica está familiarizado con el uso de dicha tecnología antisentido. Cualquier gen puede ser regulado negativamente de esta manera, y, en una forma de realización, una secuencia de ADN transcribible puede ser diseñada para la supresión de un gen específico a través de la expresión de una molécula de ARNbc, ARN interferente o miARN.

[0095] Por lo tanto, una forma de realización de la invención es una molécula de ADN recombinante que comprende un elemento regulador de la invención, tales como los proporcionados como los SEQ ID NO:1-15 o fragmento de la misma, o una secuencia con al menos 80 por ciento de identidad, al menos 81 por ciento de identidad, al menos 82 por ciento de identidad, al menos 83 por ciento de identidad, al menos 84 por ciento de identidad, al menos 85 por ciento de identidad, al menos 86 por ciento de identidad, al menos 87 por ciento de identidad, al menos 8 8 por ciento de identidad, al menos 89 por ciento de identidad, al menos 90 por ciento de identidad, al menos 91 por ciento de identidad, al menos 92 por ciento de identidad, al menos 93 por ciento de identidad, al menos 94 por ciento de identidad, al menos 95 por ciento de identidad, al menos 96 por ciento de identidad, al menos 97 por ciento de identidad, al menos 98 por ciento de identidad, al menos 99 por ciento de identidad, o 100 por ciento de identidad con respecto a cualquiera de los SEQ ID NO:1-15 o fragmento de la misma, vinculada operativamente a una secuencia heteróloga de ADN transcribible para modular la transcripción de la secuencia de ADN transcribible en un nivel deseado o en un patrón deseado cuando el constructo está integrado en el genoma de una planta transgénica celda. En una forma de realización, la secuencia de ADN transcribible comprende una región codificante de proteínas de un gen y en otra forma de realización la secuencia de ADN transcribible comprende una región antisentido de un gen o cualquier otra secuencia de ADN transcribible que cause la supresión de un gen objetivo específico.

Genes de interés agronómico

[0096] Una secuencia de ADN transcripta puede ser un gen de interés agronómico. Tal como se lo emplea en la presente invención, el término "gen de interés agronómico" o "transgén de interés

agronómico" se refiere a una secuencia de ADN transcribible que, cuando se expresa en un tejido vegetal, célula o tipo de célula en particular, confiere una característica o rasgo deseable. El producto de un gen o transgén de interés agronómico puede actuar dentro de una 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 plaguicida 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 a un constructo tal que el elemento regulador está vinculado operativamente a una secuencia de ADN transcribible que es un gen o transgén 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 no se limita a, tolerancia a herbicidas, control de insectos, rendimiento modificado o aumentado, resistencia a enfermedades, resistencia a patógenos, crecimiento y desarrollo de plantas modificadas, contenido de almidón modificado, contenido de aceite modificado, contenido de ácidos grasos modificado, contenido de proteínas modificado, maduración de frutos modificados, nutrición animal y humana mejorada, producciones de biopolímeros, tolerancia o resistencia al estrés ambiental, péptidos farmacéuticos, cualidades de procesamiento mejoradas, sabor mejorado, utilidad de producción de semillas híbridas, producción mejorada de fibra y producción deseable de biocombustibles.

[0097] Los ejemplos no limitativos de genes (o transgenes) de interés agronómico conocidos en la técnica incluyen aquellos para la resistencia a herbicidas (Patente de EE.UU. No. 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), aumento del rendimiento (Patentes de EE.UU. No. USRE38.446; 6.716.474; 6.663.906; 6.476.295; 6.441.277; 6.423.423.828; 6.399.330; 6.372.211; 6.235.971; 6.222.098; y 5.716.837), en control de la sección (Patentes de EE.UU. No. 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 EE. UU. No. 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 EE.UU. No. 6.617.496; 6.608.241; 6.015.940; 6.013.864; 5.850.023; y 5.304.730), resistencia a nematodos (Patente de EE. 6.228.992), postura de resibilidades de enfermedades bacterianas (Patente de EE. UU. No. 5. 516.671), crecimiento y desarrollo de plantas (patentes estadounidenses No. 6.723.897 y 6.518.488), producción de almidón (Patentes de EE.UU. No. 6.538.181; 6.538.179; 6.538.178; 5.750.876; 6.476.295), producción de aceites modificados (Patentes de EE.UU. No. 6.444.876; 6.426.447; y 6.380.462), alta producción de petróleo (Patentes de EE.UU. No. 6.495.739; 5.608.149; 6.483.008; y 6.476.295), contenido de ácidos grasos modificados (Patentes de EE.UU. No. 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 proteínas (Patente de EE.UU. No. 6.380.466), maduración de frutos (Patente de EE.UU. No. 5.512.466), nutrición animal y humana mejorada (Patente de EE.UU. No. 6.723.837; 6.653.530; 6.5412.59; 5.985.605; y 6.171.640), biopolímeros (Patente de EE.UU. No. USRE37.543; 6.228.623; y 5.958.745, y 6.946.588), resistencia al estrés ambiental (Patente de EE.UU. No. 6.072.103), péptidos farmacéuticos y péptidos secretables (Patentes de EE.UU. No. 6.812.379; 6.774.283; 6.140.075; y 6.080.560), procesamiento mejorado (patente No. 6.476.295), mejora de la digestibilidad (Patente de EE.UU. No. 6.531.648), rafinosa baja (Patente de EE.UU. No. 6.166.292), producción de enzimas industriales (Patente de EE.UU. No. 5.543.576), sabor mejorado (Patente de EE.UU. No. 6.011.199), fijación de nitrógeno (Patente de EE.UU. No. 5.229.114), producción de semillas híbridas (Patente de EE.UU. No. 5.689.041), producción de fibra (Patentes de EE.UU. No. 6.576.818; 6.271.443; 5.981.834; y 5.869.720) y producción de biocombustibles (Patente de EE.UU. No. 5.998.700).

[0098] Alternativamente, un gen o transgén de interés agronómico puede afectar a las características o fenotipos de la planta antes mencionados codificando una molécula de ARN que causa una modulación dirigida de la expresión génica de un gen endógeno, por ejemplo por antisentido (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 5.107.065); ARN inhibitorio ("ARNi", incluida la modulación de la expresión génica por miARN, ARN interferente, ARN interferente de acción trans, y mecanismos mediados por sARN en fases, por ejemplo, como se describe en las solicitudes publicadas en EE.UU. 2006/0200878 y en EE.UU. 2008/0066206, y en la solicitud de Patente de EE.UU. 11/974.469); o mecanismos mediados por la co-supresión. El ARN también podría ser una molécula de ARN catalítica (por ejemplo, una ribozima o un riboswitch; véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 2006/0200878) diseñada para escindir un producto de ARNm

endógeno deseado. En el arte se conocen los métodos para construir e introducir constructos en una célula de tal manera que la secuencia de ADN transcribible se transcribe en una molécula de ARN que es capaz de causar supresión de genes.

Marcadores seleccionables

[0099] Los transgenes marcadores seleccionables también pueden utilizarse con los elementos reguladores de la invención. Tal como se lo emplea en el presente documento, el término "transgén marcador seleccionable" se refiere a cualquier secuencia de ADN transcribible cuya expresión en una planta, tejido o célula transgénica, o la falta de ella, puede ser examinada o calificada de alguna manera. Los genes marcadores selectables y sus técnicas asociadas de selección y cribado, para su uso en la práctica de la invención son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ADN transcribibles que codifican ß–glucuronidasa (GUS), proteína verde fluorescente en (GFP, según sus siglas en inglés), proteínas que confieren resistencia a los antibióticos y proteínas que confieren tolerancia a herbicidas. Se proporcionan ejemplos de transgenes marcadores seleccionables como GOI-CP4-EPSPS (SEQ ID NO: 21) utilizado para la selección de células vegetales transformadas a través de la selección de glifosato y GOI-GUS (SEQ ID NO: 18), un gen reportero de GUS utilizado en el siguiente ejemplo en un casete de expresión transgénica que está destinado a permanecer en el constructo integrada después de la autoescisión para demostrar la retención del casete de expresión y determinar la cigosidad.

Nucleasas sitio-específicas

[00100] Tal como se lo emplea en la presente invención, el término "edición del genoma" se refiere a la modificación de una secuencia genética en un sitio objetivo en una molécula de ADN o el genoma o cromosoma de un organismo vivo o célula, como el genoma de una planta de cultivo para la agricultura, por supresión, sustitución y / o inserción de una secuencia de ADN en o cerca del sitio objetivo, que se puede generar utilizando una nucleasa sitio-específica. "Integración sitio-específica" o "integración dirigida al sitio" son términos utilizados para referirse a la inserción de una secuencia o constructo de ADN en el genoma o cromosoma de un organismo vivo o célula en un sitio objetivo.

[00101] Tal como aquí se lo emplea, el término "nucleasa sitio-específica" se refiere a una enzima nucleasa de corte de ADN que crea una rotura de doble cadena (DSB, según sus siglas en inglés)

o muesca en o cerca de un sitio objetivo específico o ubicación de una molécula de ADN, cromosoma o genoma.

[00102] Tal como aquí se lo emplea, un "sitio objetivo" para la edición del genoma se refiere a la ubicación de una secuencia de polinucleótidos dentro de un genoma vegetal que está unido y escindido por una nucleasa sitio-específica que introduce una ruptura de doble cadena (o muesca monocatenaria) en la columna vertebral de ácido nucleico de la secuencia de polinucleótidos y / o su cadena de ADN complementaria. Después de que se realiza la ruptura o corte, el mecanismo de reparación del ADN de la célula puede reconocer y reparar la ruptura o muesca a través de la unión de extremos no homólogos (NHEJ, según las siglas en inglés) o la reparación dirigida por homología y posiblemente introducir una mutación y / o inserción en el sitio objetivo como se entiende en la técnica.

[00103] La nucleasa sitio-específica proporcionada en este documento puede seleccionarse del grupo que consiste en una nucleasa de dedo de zinc (ZFN, según sus siglas en inglés), una meganucleasa, una endonucleasa guiada por ARN, como una nucleasa asociada a CRISPR, una endonucleasa TALE (TALEN), una recombinasa, una transposasa o posiblemente cualquier otra endonucleasa. Véase, por ejemplo, Khandagale, K. et al., "Genome editing for targeted improvement in plants ", *Plant Biotechnol Rep* 10: 327-343 (2016); y Gaj, T. et al., "ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering", *Trends Biotechnol.* 31(7): 397-405 (2013), cuyo contenido y revelación se incorporan aquí a modo de referencia. Un casete de expresión proporcionado en este documento puede codificar una nucleasa sitio-específica. Dicho casete de expresión puede comprender una secuencia de ADN transcripta que codifique la nucleasa sitio-específica vinculada operativamente a un promotor expresable de la planta. En otro aspecto, un constructo de ADN recombinante proporcionado en este documento puede comprender al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez casetes de expresión que codifican una o más nucleasas sitio-específicas.

[00104] De acuerdo con las formas de realización de la presente revelación, una recombinasa puede ser una serina recombinasa unida a un motivo de reconocimiento de ADN, una tirosina recombinasa unida a un motivo de reconocimiento de ADN u otra enzima recombinasa conocida en la técnica. Una recombinasa o transposasa puede ser una transposasa de ADN o recombinasa

unida a un dominio de unión al ADN. Se puede seleccionar una tirosina recombinasa unida a un motivo de reconocimiento de ADN del grupo que consiste en una recombinasa Cre, una recombinasa Flp y una recombinasa Tnp 1. De acuerdo con algunas formas de realización, una Cre recombinasa o una Gin recombinasa proporcionada en este documento está atada a un dominio de unión al ADN de dedos de zinc. En otra forma de realización, una serina recombinasa unida a un motivo de reconocimiento de ADN proporcionado en este documento se selecciona del grupo que consiste en una integrasa PhiC31, una integrasa R4 y una integrasa TP-901. En otra forma de realización, una transposasa de ADN unida a un dominio de unión al ADN proporcionado en este documento se selecciona del group que consiste en un TALE-piggyBac y un TALE-Mutator.

[00105] De acuerdo con las formas de realización de la presente revelación, se puede seleccionar una endonucleasa guiada por ARN o nucleasa asociada a CRISPR del grupo formado por Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7,Cas 8, Cas9 (también conocido como Csn1 y Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, Cas12a (también conocido como Cpf1), CasX, CasY, y homólogos o versiones modificadas de los mismos, Argonauta (como ejemplos no limitantes de proteínas Argonauta se pueden citar a *Thermus thermophilus* Argonauta (TtAgo), *Pyrococcus furiosus* Argonauta (PfAgo), *Natronobacterium gregoryi* Argonauta (NgAgo) y homólogos o versiones modificadas de los mismos. Según algunas formas de realización, una endonucleasa guiada por ARN puede ser una enzima Cas9 o Cas12a. En otro aspecto, una nucleasa sitio-específica proporcionada en este documento se selecciona del grupo que consiste en una enzima Cas9 o Cas12a.

[00106] Para las endonucleasas guiadas por ARN o las nucleasas asociadas a CRISPR, se puede requerir una molécula de ARN guía (ARNg) para dirigir la endonucleasa a un sitio objetivo en una molécula de ADN, cromosoma o genoma de una planta a través del emparejamiento de bases o hibridación para causar un DSB o muesca en o cerca del sitio objetivo. El ARNg puede transformarse o introducirse en una célula o tejido vegetal (tal vez junto con una nucleasa o un constructo de ADN que codifica la nucleasa) como un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN transcribible que codifica el ARN guía vinculado operativamente a un promotor expresable por la planta. Como se entiende en la técnica, un "ARN guía" puede comprender, por ejemplo, un ARN CRISPR (ARNcr), un ARN guía de cadena única

(ARNg) o cualquier otra molécula de ARN que pueda guiar o dirigir una endonucleasa a un sitio objetivo específico en el genoma. Un "ARN guía de cadena simple" (o "ARNg") es una molécula de ARN que comprende un ARNc unido covalentemente a un tracrRNA por una secuencia enlazadora, que puede expresarse como una sola transcripción o molécula de ARN. La guía RNA comprende una guía o secuencia dirigida que es idéntica o complementaria a un sitio objetivo dentro de la molécula de ADN, cromosoma o genoma vegetal. Un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) puede estar presente en el genoma inmediatamente adyacente y aguas arriba de la secuencia del sitio diana genómico 5' e nd complementaria a la secuencia de orientación del ARN guía, es *decir,* inmediatamente aguas abajo (3') a la cadena de sentido (+) del sitio diana genómico (en relación con la secuencia de orientación del ARN guía) como se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Wu, X. et al., "Target specificity of the CRISPR-Cas9 system", *Quant Biol.* 2(2): 59-70 (2014), cuyo contenido y revelación se incorporan aquí como referencia. La secuencia genómica PAM en la cadena sensorial (+) adyacente a la posición objetivoe (relativa a la secuencia de orientación del ARN guía) puede comprender 5'-NGG-3'. Sin embargo, la secuencia correspondiente del ARN guía (es *decir,* inmediatamente aguas abajo (3') a la secuencia objetivo del ARN guía) generalmente puede no ser complementaria a la secuencia PAM genómica. El ARN guía puede ser normalmente una molécula de ARN no codificante que no codifica una proteína. La secuencia guía del ARN guía puede tener al menos 10 nucleótidos de longitud, como 12-40 nucleótidos, 12-30 nucleótidos, 12-20 nucleótidos, 12-35 nucleótidos, 12-30 nucleótidos, 15-30 nucleótidos, 17-30 nucleótidos o 17-25 nucleótidos de longitud, o aproximadamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos de longitud. La secuencia guía podrá ser al menos del 95%, al menos del 96%, al menos del 97%, al menos del 99% o 100% idéntica o complementaria a al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 2 4, al menos 25 o más nucleótidos consecutivos de una secuencia de ADN en el sitio objetivo. Un casete de expresión proporcionado en este documento puede codificar un ARN guía. Dicho casete de expresión puede comprender una secuencia de ADN transcripta que codifique el ARN guía alineado operativamentea un promotor expresable de la planta. En otro aspecto, un constructo de ADN recombinante proporcionada en este documento puede comprender al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al

menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez casetes de expresión que codifican uno o más ARN guía(s).

[00107] Las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) son proteínas sintéticas que consisten en un dominio de unión al ADN de dedo de zinc fusionado con un dominio de escisión (o un semidominio de escisión), que puede derivarse de una endonucleasa de restricción (por *e*jemplo, Fok1). El dominio de unión al ADN puede ser canónico (C2H2) o no canónico (por ejemplo, C3H o C4). El dominio de unión al ADN puede comprender uno o más dedos de zinc (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más dedos de zinc) dependiendo del sitio objetivo. Múltiples dedos de zinc en un dominio de unión al ADN pueden estar separados por secuencias de enlace. Los ZFN pueden diseñarse para escindir casi cualquier tramo de ADN bicatenario mediante la modificación del dominio de unión al ADN del dedo de zinc. Los ZFN forman dímeros a partir de monómeros compuestos de un dominio de escisión de ADN no específico (por ejemplo, derivado de la nucleasa *FokI*) fusionado a un dominio de unión al ADN que comprende una matriz de dedos de zinc diseñada para unirse a una secuencia de ADN del sitio objetivo. El dominio de unión al ADN de un ZFN puede estar compuesto normalmente de 3-4 (o más) dedos de zinc. Los aminoácidos en las posiciones -1, +2, +3 y +6 relativas al inicio de la hélice a del dedo de zinc, que contribuyen a la unión sitio-específica al sitio objetivo, se pueden cambiar y personalizar para adaptarse a secuencias objetivo específicas. Los otros aminoácidos pueden formar una columna vertebral de consenso para generar ZFN con diferentesespecificidades de secuencia nt. Los métodos y reglas para diseñar ZFN para apuntar y vincular secuencias de destino específicas se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, las solicitudes de patentes de los EE.UU. No. 2005/0064474, 2009/0117617 y 2012/0142062, cuyo contenido y revelación se incorporan aquí a modo de referencia. El dominio de la nucleasa *Fok1* puede requerir dimerización para escindir el ADN y, por lo tanto, se necesitan dos ZFN con sus regiones C-terminales para unirse a cadenas de ADN opuestas del sitio de escisión (separadas por 5-7 pb). El monómero ZFN puede cortar el sitio objetivo si los dos sitios de unión ZF son palindrómicos. Un ZFN, tal como aquí se lo emplea, es amplio e incluye un ZFN monomérico que puede escindir un ADN bicatenario sin la ayuda de otro ZFN. El término ZFN también se puede usar para referirse a uno o a ambos miembros de un par de ZFN que están diseñados para trabajar juntos para escindir el ADN en el mismo sitio.

[00108] Sin estar limitado por ninguna teoría científica, debido a que las especificidades de unión al ADN de los dominios de dedos de zinc se pueden rediseñar utilizando alguno de entre varios

métodos, los ZFN personalizados pueden teóricamente ser construidos para dirigirse a casi cualquier secuencia objetivo (por ejemplo, en o cerca de un gen de la oxidasa GA en un genoma vegetal). Los métodos disponibles públicamente para diseñar dominios de dedos de zinc incluyen Ensamblaje dependiente del Contexto (CoDA, según sus siglas en inglés), Ingeniería de grupos oligomerizados (OPEN, según sus siglas en inglés) y Ensamblaje Modular. En un aspecto, un método y/o composición proporcionados en este documento comprende uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más ZFN. En otro aspecto, un ZFN proporcionado en este documento puede generar un DSB objetivo o muesca. En un aspecto, los vectores que comprenden polinucleótidos que codifican uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más ZFN se proporcionan a una célula mediante métodos de transformación conocidos en la técnica (por ejemplo, sin ser limitantes, transfección viral, bombardeo de partículas, transfección de protoplastos mediada por PEG o *mediada por Agrobacterium*). Las ZFN se pueden introducir como proteínas ZFN, como polinucleótidos que codifican proteínas ZFN y/o como combinaciones de proteínas y polinucleótidos codificados de proteínas.

[00109] Las meganucleasas, que son comúnmente identificadas en microbios, tales como la familia LAGLIDADG de endonucleasas 'homing', son enzimas únicas con alta actividad y largas secuencias de reconocimiento (> 14 pb) que resultan en la digestión sitio-específica del ADN objetivo. Las versiones diseñadas de meganucleasas naturales suelen tener secuencias de reconocimiento de ADN extendidas (por ejemplo, de 14 a 40 pb). Según algunas formas de realización, una meganucleasa puede comprender un andamio o enzima base seleccionada del grupo formado por I-CreI, *I-CeuI*, *I-MsoI*, *I-SeeI, I-AniI* e *I-DmoI.* La ingeniería de las meganucleasas puede ser más desafiante que las ZFN y TALEN porque el reconocimiento del ADN y las funciones de escisión de las meganucleasas están entrelazadas en un solo dominio. Se han utilizado métodos especializados de mutagénesis y cribado de alto rendimiento para crear nuevas variantes de meganucleasas que reconocen secuencias únicas y poseen una actividad nucleasa mejorada. Por lo tanto, una meganucleasa puede ser seleccionada o diseñada para unirse a una secuencia objetivo genómica en una planta. En un aspecto, un método y/o composición aquí provisto comprende una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más meganucleasas. En otro aspecto, una meganucleasa puede generar un corte o rotura dirigida.

[00110] Las nucleasas generadoras de zinc (ZFN) y las nucleasas efectoras TAL (TALEN) son enzimas quiméricas que combinan una nucleasa y un dominio de unión al ADN. Las TALEN son

una clase de nucleasas específicas de secuencia que se pueden usar para hacer roturas de doble cadena en secuencias objetivo específicas en el genoma de una planta u otro organismo. Los TALENs son enzimas de restricción generadas al fusionar el dominio de unión al ADN efector similar al activador de la transcripción (TALE) a un dominio de nucleasa (por ejemplo, *FokI*). Cuando cada miembro de un par TALEN se une a los sitios de ADN que flanquean un sitio objetivo, los monómeros *FokI* se dimerizan y provocan una ruptura de ADN de doble cadena en el sitio objetivo. Además del dominio de escisión *FokI* de tipo salvaje, se han diseñado variantes del dominio de escisión *FokI* con mutaciones para mejorar la especificidad y la actividad de la escisión. El dominio *FokI* funciona como un dímero, requiriendo dos constructos con dominios únicos de unión al ADN para sitios en el genoma objetivo con orientación y espaciado adecuados. Tanto el número de residuos de aminoácidos entre el dominio de la unión principal del ADN de TALEN y el dominio de escisión *FokI* y el número de bases entre los dos sitios de unión individuales de TALEN son parámetros para lograr altos niveles de actividad. Los TALEN son enzimas de restricción artificial generadas al fusionar el dominio de unión al ADN efector (TALE) similar a un activador de la transcripción a un dominio de nucleasa. En algunos aspectos, la nucleasa se selecciona del grupo formado por *PvuII, MutH*, *TevI*, *FokI*, *AlwI*, *MlyI*, *SbfI*, *SdaI*, *StsI*, *CleDORF, Clo051* y *Pept071.* Cuando cada miembro de un par TALEN se une a los sitios ADN que flanquean un sitio objetivo, los monómeros *FokI* se dimerizan y causan una ruptura de ADN bicatenario en el sitio objetivo. El término TALEN, Tal como aquí se lo emplea, es amplio e incluye un TALEN monomérico que puede escindir el ADN bicatenario o de doble cadena sin la ayuda de otro TALEN. El término TALEN también se refiere a uno o ambos miembros de un par de TALEN que trabajan juntos para escindir el ADN en el mismo sitio.

[00111] Los efectores similares a activadores de transcripción (TALE) se pueden diseñar para unirlos a prácticamente cualquier secuencia de ADN, como, por ejemplo, en o cerca del locus genómico de un gen GA oxidasa en una planta. TALE tiene un dominio central de unión al ADN compuesto por 13-28 monómeros repetidos de 33-34 aminoácidos. Los aminoácidos de cada monómero están altamente conservados, excepto los residuos de aminoácidos hipervariables en las posiciones 12 y 13. El dominio de unión al ADN de los efectores TALE puede contener 33-35 repeticiones de secuencia de aminoácidos que incluyen un di-residuo variable de repetición (RVD, según las siglas en inglés) en los residuos 12 y 13, determinando su especificidad en la unión al ADN. Cada repetición une un nucleótido específico que ha facilitado la ingeniería de

dominios específicos de unión al ADN mediante la selección de una combinación de segmentos de repetición que contienen el RVD apropiado. El número de repeticiones de la secuencia de la RVD determina la longitud y la secuencia de la secuencia objetivo que será reconocida (Podevin *et al.* (2013) Trends in Biotechnology 31(6): 375-383). Los dos aminoácidos variables se denominan diresiduos variables de repetición (RVD). Los pares de aminoácidos de RVD reconocen preferentemente ciertas bases de nucleótidos, y la modulación de RVD puede reconocer bases de ADN consecutivas. Esta simple relación entre la secuencia de aminoácidos y el reconocimiento del ADN ha permitido la ingeniería de dominios específicos de unión al ADN mediante la selección de una combinación de segmentos repetidos que contienen los RVD apropiados.

[00112] Además del dominio de escisión *FokI* de tipo salvaje, se han diseñado variantes del dominio de escisión *FokI* con mutaciones para mejorar la especificidad y la actividad de la escisión. El dominio *FokI* funciona como un dímero, requiriendo dos constructos con dominios únicos de unión al ADN para sitios en el genoma objetivo con orientación y espaciado adecuados. Tanto el número de residuos de aminoácidos entre el dominio de unión al ADN TALEN y el dominio de escisión *FokI* como el número de bases entre los dos sitios de unión individuales de TALEN son parámetros para lograr altos niveles de actividad. Los dominios de escisión *PvuII MutH* y *TevI* son alternativas útiles para las variantes *FokI* y *FokI* para su uso con TALE. *PvuII* funciona como un dominio de escisión altamente específico cuando se acopla a un TALE *(*Véase Yank *et al.* 2013. *PLoS One.* 8: E82539). *MutH* es capaz de introducir muescas específicas de cadena en el ADN (Véase Gabsalilow *et al.* 2013. *Nucleic Acids Research.* 41: e83). *Tevl* introduce roturas de doble cadena en el ADN en sitios específicos (Véase Beurdeley *et al.,* 2013. *Nature Comm.* 4: 1762). La relación entre la secuencia de aminoácidos y el reconocimiento de ADN del dominio de unión TALE permite proteínas que se pueden diseñar. Los programas de software como DNA Works se pueden utilizar para diseñar constructos TALE. Otros métodos de diseño de constructos TALE son conocidos por aquellos con conocimientos de la técnica. Véase Doyle *et al., Nucleic Acids Research* (2012) 40: Wl 17-122.; Cermak *et al., Nucleic Acids Research* (2011). 39:e82; y tale-nt.cac.comell.edu/about. En un aspecto, un constructo de ADN recombinante proporcionada en este documento comprende uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más TALEN. En otro aspecto, un TALEN proporcionado en el presente documento es capaz de generar un corte o ruptura específico en un sitio objetivo.

[00113] Las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) comprenden un dominio de unión al ADN de dedo de zinc y un dominio inductor de doble rotura. La especificidad del sitio de reconocimiento es conferida por el dominio del dedo de zinc, que puede comprender dos, tres o cuatro dedos de zinc, por ejemplo, teniendo una estructura C2H2, aunque otras estructuras de dedos de zinc son conocidas y han sido diseñadas. Los dominios de los dedos de zinc pueden ser susceptibles de diseñar polipéptidos que se unan específicamente a una secuencia de reconocimiento de polinucleótidos seleccionada. Las ZFN comprenden un dominio de dedo de zinc de unión al ADN diseñado unido a un dominio de endonucleasa no específico, por ejemplo, el dominio de nucleasa de una endonucleasa de tipo II, como FokI. Se pueden fusionar funcionalidades adicionales al dominio de unión de dedos de zinc, incluidos los dominios activadores transcripcionales, los dominios represores de transcripción y las metilasas. En algunos ejemplos, la dimerización del dominio nucleasa es necesaria para la actividad de escisión. Cada dedo de zinc reconoce tres pares de bases consecutivos en el ADN objetivo. Por ejemplo, un dominio de tres dedos reconoce una secuencia de nueve nucleótidos contiguos, con un requisito de dimerización de la nucleasa, se utilizan dos juegos de tripletes de dedos de zinc para unirse a una secuencia de reconocimiento de dieciocho nucleótidos (Gaj *et al.* (2013) Trends Biotechnology, 31(7): 397-405; y Urnov *et al.* (2010) Nature Reviews Genetics, 11: 636-646).

Transformación celular

[00114] La invención también está dirigida a un método de producción de células y plantas transformadas que comprenden uno o más elementos reguladores vinculados operativamente a una secuencia de ADN transcrisable.

[00115] El término "transformación" se refiere a la introducción de una molécula de ADN en un huésped receptor. Tal como se usa en la presente invención, el término "huésped" se refiere a bacterias, hongos o plantas, incluidas las células, tejidos, órganos o progenie de la bactéria, hongos o plantas. Los tejidos y células vegetales de particular interés incluyen protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, plántulas, embriones y polen.

[00116] Tal como aquí se lo emplea, 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 tal manera que la molécula de ADN introducida sea

heredada por la subsiguiente progenie. 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 mejoramiento que emplea a dicho organismo transgénico como padre en un cruce y exhibe un fenotipo alterado resultante de la presencia de una molécula de ADN extraña. 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 contenga una o más moléculas heterólogas de ADN.

[00117] Hay muchos métodos bien conocidos por aquellos con conocimientos en la técnica para introducir moléculas de ADN y transformar las células vegetales. El proceso generalmente comprende los pasos de seleccionar una célula huésped o explante adecuada, transformar la célula o explante con una molécula o vector, y obtener una célula 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, pero no se limitan a, infección bacteriana (por ejemplo, *Agrobacterium*), vectores binarios BAC, entrega directa de ADN (por ejemplo, por 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. Según determinadas formas de realización, los métodos de transformación incluyen la transformación mediada por *Agrobacterium* o *Rhizobium* o el bombardeo de partículas o la transformación mediada por microproyectiles.

[00118] Las células huésped pueden ser cualquier célula u organismo, como una célula vegetal, célula de algas, algas, células fúngicas, hongos, células bacterianas o células de insectos. En formas específicas de realización, las células huésped y las células transformadas pueden incluir células de plantas de cultivo.

[00119] Una planta transgénica puede ser posteriormente regenerada a partir de una célula vegetal transgénica de la invención. Utilizando técnicas de reproducción convencional o autopolinización, se pueden producir semillas a partir de esta planta transgénica. Dicha semilla, y la planta progenie

resultante cultivada a partir de dicha semilla, contendrá la molécula de ADN recombinante de la invención, y por lo tanto será transgénica.

[00120] Las plantas transgénicas de la invención pueden ser autopolinizadas para proporcionar semilla para plantas transgénicas homocigotas de la invención (homocigotas para la molécula de ADN recombinante) o cruzadas con plantas no transgénicas o diferentes plantas transgénicas para proveer semillas para plantas transgénicas heterocigotas de la invención (heterocigotas para la molécula de ADN recombinante). Tanto estas plantas transgénicas homocigotas como heterocigotas se denominan aquí "plantas de progenie". Las plantas de progenie son plantas transgénicas descendientes de la planta transgénica original y que contienen la molécula de ADN recombinante de la invención. Las semillas producidas utilizando una planta transgénica de la invención pueden ser cosechadas y utilizadas para cultivar generaciones de plantas transgénicas, es decir, plantas progenie de la invención, que comprenden el constructo de esta invención y expresan un gen de interés agronómico. Las descripciones de los métodos de reproducción que se utilizan 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 y Hendriksen, *Plant breeding Perspectives*, Wageningen (ed), Centro para Publicaciones y Documentación sobre Agricultura (1979); Fehr, *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, segunda edición, Monograph, 16:249 (1987); Fehr, *Principles of Variety Development*, *Theory and Technique*, (Vol. 1) y *Crop Species Soybean* (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987).

[00121] Las plantas transformadas pueden ser analizadas para detectar la presencia del gen o genes de interés y el nivel de expresión y/o perfil conferido por los elementos reguladores de la invención. Los expertos en la técnica saben acerca de los numerosos métodos disponibles para el análisis de plantas transformadas. Por ejemplo, los métodos para el análisis de plantas incluyen, entre otros, a los Southern blots o Northern Blots, enfoques basados en PCR, análisis bioquímicos, métodos de detección fenotípicos, evaluaciones de campo y ensayos de inmunodiagnóstico. La expresión de una secuencia de ADN transcribible se puede medir utilizando reactivos y métodos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) descriptos por el fabricante y tiempos de ciclo de PCR determinados utilizando TaqMan® Testing Matrix. Alternativamente, los reactivos y

métodos Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) descriptos por el fabricante se pueden usar para evaluar la expresión transgénica.

[00122] La invención también proporciona partes de una planta de la invención. Las partes de las plantas incluyen, entre otras, hojas, tallos, raíces, tubérculos, semillas, endosperma, óvulos y polen. Las partes vegetales 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.

[00123] Asimismo, la invención proporciona un commodity 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 formado por los SEQ ID NO: 1-15. Tal como se lo emplea en la presente invención, un "commodity" se refiere a cualquier composición o producto que esté compuesto de material derivado de una planta, semilla, célula vegetal o parte de la planta transgénica que contenga la molécula de ADN recombinante de la invención. Los commodities incluyen, entre otros, semillas procesadas, granos, partes de plantas y harinas. Un commodity 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 utilizarse para determinar el contenido o la fuente del commodity. Se puede utilizar cualquier método estándar de detección de moléculas de ADN, incluidos los métodos de detección descriptos en el presente documento.

[00124] La invención puede entenderse más fácilmente a través de la referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden limitar la invención, a menos que así se especifique. Los expertos en la técnica sabrán apreciar que las técnicas reveladas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención. Sin embargo, aquellos con conocimientos en la técnica sabrán, a la luz de la presente revelación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las formas de realización específicas que se revelan y aún así obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención, por lo tanto, todo lo expuesto debe interpretarse como ilustrativo y no en un sentido limitativo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1
Identificación de elementos reguladores capaces de impulsar la autoescisión en plantas de cultivo

[00125] Este ejemplo presenta los elementos reguladores que han sido identificados durante muchos años de experimentación y que son capaces de impulsar la autoescisión eficiente en maíz, soja y algodón transgénicos.

[00126] Los elementos reguladores con el potencial de impulsar la autoescisión eficiente en plantas de cultivos transgénicos se identificaron por primera vez a través de una combinación de búsquedas bibliográficas y en bases de datos públicas y privadas. Se ensayaron más de cien constructos vectoriales de transformación binaria de maíz que comprenden diferentes elementos y combinaciones reguladoras para una autoescisión eficiente utilizando el sistema de recombinasa Cre/Lox. A partir de dichos estudios, se identificó un pequeño número de elementos reguladores que proporcionaron una autoescisión eficiente, los que se presentan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Elementos reguladores que proporcionan una autoescisión eficiente en plantas de cultivo.

Descripción	SEQ ID NO.	Descripción y/o elementos reguladores de EXP vinculados en dirección 5' → 3' (SEQ ID NO:)
EXP-Zm.BabyBoom2	1	EXP: P-Zm.BabyBoom2:2 (SEQ ID NO:2); L-Zm.BabyBoom2:1 (SEQ ID NO:3); I-Zm.BabyBoom2:1 (SEQ ID NO:4)
P-Zm.BabyBoom2:2	2	Promotor
L-Zm.BabyBoom2:1	3	Líder
I-Zm.BabyBoom2:1	4	Intrón
T-Zm.BabyBoom2:1	5	3' UTR
EXP-Zm.GRMZM2G512113_GSI85	6	EXP: P-Zm.GRMZM2G512113:1 (SEQ ID NO:7); I-Zm.GSI85.nno:1 (SEQ ID NO:8)
P-Zm.GRMZM2G512113:1	7	Promotor + Líder
I-Zm.GSI85.nno:1	8	Intrón
T-Zm.GRMZM2G512113:1	9	3' UTR
EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7	10	EXP: P-SETvi.SPO11-1:1 (SEQ ID NO:11); L-SETvi.SPO11-1:1 (SEQ ID NO:12); I-SETit.Eef7:2 (SEQ ID NO:13)
P-SETvi.SPO11-1:1	11	Promotor
L-SETvi.SPO11-1:1	12	Líder
I-SETit.Eef7:2	13	Intrón
T-SETvi.SPO11-1:1	14	3' UTR

T-SACra.Hsp16.9:29	15	3' UTR

Ejemplo 2
Zea mays BabyBoom2 y Zm.GRMZM2G512113 EXPs es capaz de impulsar la autoescisión en plantas de maíz transformadas de manera estable

[00127] Las plantas de maíz se transformaron con constructos de ADN recombinante, específicamente constructos de transformación de plantas, que comprenden diferentes elementos reguladores de la expresión de una Cre-recombinasa para evaluar la capacidad y eficiencia de la Cre-recombinasa expresada bajo el control de los diferentes elementos reguladores en la conducción de la autoescisión del casete de expresión Cre-recombinasa junto con múltiples casetes de expresión.

[00128] Las plantas de maíz se transformaron con constructos binarios de transformación de plantas que comprenden 5 casetes de expresión transgénica: un casete de expresión Cre-recombinasa, un casete de expresión génica marcador seleccionable, un casete de expresión utilizado para la expansión de Cas12a y un casete de expresión utilizado para la expresión de unARN guía (ARNg), todos flanqueados por dos sitios LoxP (SEQ ID NO: 20); y un quinto casete de expresión ubicado fuera del LoxP. sitios que expresan un transgén ß–glucuronidasa (GUS). El casete de expresión Cre-recombinasa se utilizó para analizar diferentes EXP para probar su capacidad para impulsar la autoescisión eficiente del casete de expresión Cre-recombinasa, el casete de expresión génica marcadora, el casete de expresión Cas12a y el casete de expresión de ARNgubicado entre los sitios LoxP. El casete de expresión Cre-recombinasa estaba compuesto por un EXP para ser probado, vinculado operativamente 5' a una secuencia de codificación sintética (por ejemplo, un codón rediseñado para su expresión en una célula vegetal) que codifica una Cre-recombinasa (GOI-Cre_1, SEQ ID NO: 16) que contiene un intrón procesable derivado del gen ST-LS1 específico de tejido inducible por luz de la papa (No. de acceso al GenBank: X04753), vinculado operativamente 5' a 3' UTR. Cada constructo de transformación vegetal comprendía un casete de expresión génica marcador utilizado para la expresión de una secuencia codificante CP4-EPSPS (SEQ ID NO: 21), impulsada por un promotor constitutivo, y se utilizó para la selección de células vegetales transformadas mediante selección de glifosato. Se clonaron dos casetes de expresión adicionales adyacentes a los casetes de expresión Cre y CP4, uno utilizado

para la expresión de Cas12a impulsado por un promotor constitutivo y el otro utilizado para la expresión de un ARNg impulsado por un promotor de la polimerasa III.

[00129] Los 4 casetes de expresión, el casete de expresión génica marcadora, el casete de expresión Cre-recombinasa, el casete de expresión Cas12a y el casete de expresión de gRNA estaban flanqueados por dos secuencias de reconocimiento de recombinasa LoxP Cre (SEQ ID NO: 20) en una orientación de cabeza a cola. Se esperó que la expresión de la Cre-recombinasa dentro de la célula vegetal transformada resultara en la escisión de los cuatro casetes de expresión si la autoescisión era efectiva. El casete de expresión GUS se clonó fuera de las secuencias de reconocimiento de recombinasa LoxP Cre y se utilizó un promotor constitutivo para conducir una secuencia codificante que codifica ß–glucuronidasa (GOI-GUS, SEQ ID NO: 18) que comprendía un intrón procesable derivado del gen ST-LS1 específico del tejido inducible por luz de la papa (Acceso al GenBank: X04753).

[00130] Dos EXP, EXP-Zm.BabyBoom2 y EXP-Zm.GRMZM2G512113_GSI85 derivados de los genes de maíz se vincularon operativamente a una secuencia de ADN transcribible que codifica una recombinasa Cre (GOI-Cre_1, SEQ ID NO: 16) y se analizaron por su capacidad para impulsar la autoescisión en plantas de maíz transformadas de manera estable. EXP-Zm.BabyBoom2 (SEQ ID NO:1) comprendía un promotor P-Zm.BabyBoom2:2 (SEQ ID NO:2), vinculado operativamente 5' a un líder L-Zm.BabyBoom2:1 (SEQ ID NO:3), vinculado operativamente 5' a un intrón (I-Zm.BabyBoom2:1, SEQ ID NO:4). EXP-Zm.GRMZM2G512113_GSI85 (SEQ ID NO:6) estaba compuesto por un promotor y líder (P-Zm.GRMZM2G512113:1, SEQ ID NO:7), vinculado operativamente 5' a un intrón sintético (I-Zm.GSI85.nno:1, SEQ ID NO:8). Cada casete de expresión EXP/Cre_1 comprendía una secuencia codificante correspondiente de 3' UTR (T-Zm.BabyBoom2:1, SEQ ID NO:5 y T-Zm.GRMZM2G512113:1, SEQ ID NO:9) derivada del mismo gen del que se derivó el promotor vinculado operativamente 3' a la secuencia codificante Cre_1 (GOI-Cre_1, SEQ ID NO:16) dentro del casete de expresión.

[00131] Las células veegetales de la planta de maíz se transformaron, utilizando las constructos binarios de transformación de plantas descriptas anteriormente por la transformación mediada por *Agrobacterium*. Los métodos para la transformación mediada por *Agrobacterium* son bien conocidos en la técnica. Las células vegetales transformadas resultantes se regeneraron en plantas de maíz bajo la selección de glifosato.

[00132] Se seleccionaron plantas de una sola copia y de dos copias de R_0 y se les permitió autopolinizarse. Las plantas R_1 resultantes se analizaron para detectar la presencia de los casetes de expresión Cre, CP4 y GUS utilizando un ensayo TAQMAN®. La cigosidad de las plantas R_1 para el constructo integrada también se determinó mediante un ensayo TAQMAN® para el transgén GUS. Se infirió la ausencia del casete CP4 para indicar la ausencia de los 4 casetes que se clonaron entre las dos secuencias de reconocimiento LoxP. La Tabla 2 a continuación muestra el número total y el porcentaje de semillas R_1 libres de marcadores homocigotos y hemicigotos de los dos EXP diferentes.

Tabla 2. Número total y porcentaje de plantas libres de R_1 homocigotas y hemicigotas de los dos EXP diferentes.

EXP SEQ ID NO:	3' UTR SEQ ID NO:	Número total de plantas	Número total de marcadores homocigotos libres	Número total de marcadores hemicigotos libres	Porcentaje de marcadores homocigotos libres	Porcentaje de marcadores hemicigotos libres
1	5	1323	13	158	0,98	11,94
6	9	859	6	80	0,70	9,31

[00133] Como se puede ver en la Tabla 2 anterior, EXP-Zm.BabyBoom2 (SEQ ID NO: 1) y EXP-Zm.GRMZM2G512113_GSI85 (SEQ ID NO: 6) pudieron impulsar la autoescisión, lo que resultó en muchas plantas libres de marcadores hemicigotos y plantas libres de marcadores homocigotos.

Ejemplo 3
EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 es capaz de impulsar la autoescisión en plantas de maíz transformadas de manera estable

[00134] Las plantas de maíz se transformaron con constructos de ADN recombinante, específicamente constructos de transformación de plantas, que comprenden EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO: 10) que impulsan la expresión de una E-recombinasa Cr para evaluar la capacidad y eficiencia de la Cre-recombinasa expresada bajo el control de EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO: 10) y 2 diferentes 3' UTR para impulsar la autoescisión del casete de expresión Cre-recombinasa junto con el casete de expresión de marcador seleccionable.

[00135] Las plantas de maíz se transformaron con constructos binarias de transformación de plantas que comprenden 3 casetes de expresión transgénica: un casete de expresión Cre-recombinasa, un casete de expresión génica marcador seleccionable, flanqueado por dos sites LoxP

(SEQ ID NO: 20); y un tercer casete de expresión ubicado fuera de los sitios LoxP que expresan el transgén TIC10746_3 toxina de insectos (SEQ ID NO: 19). El casete de expresión Cre-recombinasa se utilizó para analizar el EXP, EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO: 10) por su capacidad para impulsar la autoescisión eficiente del casete de expresión Cre-recombinasa y el casete de expresión génica marcador ubicado entre los sitios de reconocimiento LoxP. Se realizaron dos constructos con un casete de expresión Cre que comprende el EXP y uno de dos diferentes 3' UTRs T-SETvi.SPO11-1:1 (SEQ ID NO:14) o T-SACra.Hsp16.9:29 (SEQ ID NO:15). El casete de expresión Cre-recombinasa estaba compuesto por EXP, EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO:10), vinculado operativamente 5' a una secuencia codificante sintética (por ejemplo, un codón rediseñado para su expresión en una célula vegetal) que codifica una Cre-recombinasa (GOI-Cre_2, SEQ ID NO:17) que contiene un intrón procesable derivado del gen *Setaria italica* LS8 (solicitud de patente de Estados Unidos US20190292542, SEQ ID NO:244), vinculado operativamente 5' a uno de los dos 3' UTR, T-SETvi.SPO11-1:1 (SEQ ID NO:14) o T-SACra.Hsp16.9:29 (SEQ ID NO:15). Cada constructo de transformación vegetal comprendía un casete marcador de expresión génica utilizado para la expresión de una secuencia codificante CP4-EPSPS (SEQ ID NO:21), dividida por un promotor constitutivo, y se utilizó para la selección de células vegetales transformadas mediante la selección de glifosato.

[00136] Los 2 casetes de expresión, el casete de expresión génica marcador y el casete de expresión Cre-recombinasa estaban flanqueados por dos secuencias de reconocimiento de ecombinasa LoxP Cre-r(SEQ ID NO:20) con una orientación de cabeza a cola. Era de esperar que la expresión de la Cre-recombinasa dentro de la célula vegetal transformada resultara en la escisión de los 2 casetes de expresión si la autoescisión era efectiva. El casete de expresión TIC 10746_3 se clonó fuera de las secuencias de reconocimiento de recombinasa LoxP Cre y se utilizó un promotor constitutivo para conducir una secuencia de codificación de codificación sintética TIC10746_3.

[00137] Las células vegetales de maíz se transformaron, utilizando constructos binarios de transformación de plantas descriptos anteriormente por la transformación mediada por *Agrobacterium*. Los métodos para la transformación mediada por *Agrobacterium* son bien conocidos en la técnica. Las células vegetales transformadas resultantes se regeneraron en plantas de maíz bajo la selección de glifosato.

[00138] Se seleccionaron plantas de una y dos copias de R_0 y se les permitió autopolinizarse. Las plantas R_1 resultantes se analizaron para detectar la presencia de los casetes de expresión Cre, CP4 y TIC10746_3 utilizando un ensayo TAQMAN®. La cigosidad de las plantas R_1 para la estructura integrada también se determinó mediante un ensayo TAQMAN® del transgén TIC10746_3. Se infirió que la ausencia del casete CP4 indicaba la ausencia de ambos casetes que fueron clonados entre las dos secuencias de reconocimiento LoxP. La Tabla 3 a continuación muestra el número total de plantas y porcentaje de marcadores homocigotas y hemicigotas libres de R_1 de los dos constructos diferentes.

Tabla 3. Número total y porcentaje de plantas R_1libres de maarcadores homocigotas y hemicigotas de los dos constructos diferentes.

EXP SEQ ID NO:	3' UTR SEQ ID NO:	Número total de plantas	Número total de marcadores homocigotos libres	Número total de marcadores hemicigotos libres	Porcentaje de marcadores homocigotos libres	Porcentaje de marcadores hemicigotos libres
10	14	207	0	56	0	27,1
10	15	399	0	65	0	16,3

[00139] Como se puede ver en la Tabla 3 anterior, EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO: 10) pudo impulsar una autoescisión eficiente utilizando cualquiera de los dos UTR de 3', T-SETvi.SPO11-1: 1 (SEQ ID NO: 14) o T-SACra.Hsp16.9: 29 (SEQ ID NO: 15), lo que resultó en muchas plantas R_1 libres de marcadores hemicigotos de ambos EXP.

Ejemplo 4
EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 es capaz de impulsar la autoescisión en plantas de maíz transformadas de forma estable

[00140] Las plantas de maíz se transformaron con constructos de ADN recombinante, específicamente constructos de transformación de plantas, que comprenden EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO: 10) que impulsan la expresión de una Cre-recombinasa para evaluar la capacidad y eficiencia de la Cre-recombinasa expresada en el control de EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO: 10)y 2 diferentes 3' UTR para impulsar la autoescisión del casete de expresión Cre-recombinase junto con otros tres casetes de expresión flanqueados por sitios LoxP.

[00141] Las plantas de maíz se transformaron con dos constructos de transformación de plantas binarios similares a los descriptas en el Ejemplo 2, que comprenden 5 casetes de expresión transgénica: un casete de expresión Cre-recombinasa, un casete de expresión génica marcador seleccionable, un casete de expresión utilizado para la expresión de Cas12a y un casete de expresión utilizado para la expresión de un ARN guía (ARNg), todos flanqueados por dos LoxP. sitios (SEQ ID NO: 20); y un casete de quinta expresión ubicado fuera de los sitios LoxP que expresa un transgén ß–glucuronidasa (GUS). El casete de expresión Cre-recombinasa estaba compuesto por el EXP, EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO:10), vinculado operativamente 5' a una secuencia codificante sintética (por ejemplo, un codón rediseñado para su expresión en una célula vegetal) que codifica una Cre-recombinasa (GOI-Cre_1, SEQ ID NO:16) que contiene un intrón procesable derivado de la *Setaria italica* Gen LS8 (solicitud de patente de Estados Unidos US20190292542, SEQ ID NO: 244), vinculado operativamente 5' a uno de los dos 3' UTR, T-SETvi.SPO11-1:1 (SEQ ID NO:14) o T-SACra.Hsp16.9:29 (SEQ ID NO:15).

[00142] Las células vegetales de maíz se transformaron, utilizando los constructos binarios de transformación de plantas descriptas anteriormente por la transformación mediada por *Agrobacterium*. Los métodos para la transformación mediada por *Agrobacterium* son bien conocidos en la técnica. Las células vegetales transformadas resultantes se regeneraron en plantas de maíz bajo la selección de glifosato.

[00143] Se seleccionaron plantas de una sola copia y dos plantas de R_0 y se les permitió autopolinizarse. Las plantas R_1 resultantes se analizaron para detectar la presencia de los casetes de expresión Cre, CP4 y GUS utilizando un ensayo TAQMAN®. La cigosidad de las plantas R_1 para el constructo integrada también se determinó mediante un ensayo TAQMAN® para el transgén GUS. Se infirió que la ausencia del casete CP4 indicaba la ausencia de los 4 casetes que se clonaron entre las dos secuencias de reconocimiento LoxP. La Tabla 4 a continuación muestra el número total y el porcentaje de semillas libres de R_1 homocigotas y hemicigotas de los dos EXP diferentes.

Tabla 4. Número total y porcentaje de plantas libres de R_1 homocigotas y hemicigotas **de los dos constructos diferentes.**

EXP SEQ ID NO:	3' UTR SEQ ID NO:	Número total de plantas	Número total de marcadores homocigotos libres	Número total de marcadores hemicigotos libres	Porcentaje de marcadores homocigotos libres	Porcentaje de marcadores hemicigotos libres
10	14	1214	7	133	0,58	10,96
10	15	1236	17	177	1,38	14,32

[00144] Como se puede ver en la Tabla 4 anterior, EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO: 10) pudo impulsar una autoescisión eficiente utilizando cualquiera de los dos UTR de 3', T-SETvi.SPO11-1: 1 (SEQ ID NO: 14) o T-SACra.Hsp16.9: 29 (SEQ ID NO: 15), lo que resultó en muchas plantas R_1 libres de marcadores hemicigotos de ambos EXP.

Ejemplo 5
Ensayo de la actividad EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 en plantas de maíz transformadas de manera estable

[00145] Las plantas de maíz se transformaron con constructos de ADN recombinante, específicamente constructos de transformación de plantas, que comprenden EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO: 10) y 2 diferentes 3' UTR que impulsan la expresión de un transgén ß–glucuronidasa (GUS). Los pacientes resultantes se analizaron para la expresión de la proteína GUS, para evaluar el efecto del grupo de elementos reguladores (EXP) en la expresión.

[00146] Las plantas de maíz se transformaron con dos constructos de expresión GUS de plantas. El EXP, EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO: 10) se clonó en un constructo de expresión vegetal base utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. El constructo de expresión vegetal resultante contenía una región de borde izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete de selección de transgenes utilizado para la selección de células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato, un segundo casete transgénico para evaluar la actividad de EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 compuesto por un casete transgénico que comprende EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO:10) vinculado operativamente 5' a una secuela codificante para GUS (SEQ ID NO:18) compuesto por un intrón procesable, vinculado operativamente 5' a uno de las dos 3' UTR, T-SETvi.SPO11-1:1 (SEQ ID NO:14) o T-SACra.Hsp16.9:29 (SEQ ID NO:15), y una región fronteriza derecha de *Agrobacterium tumefaciens*.

[00147] Las células vegetales de maíz se transformaron utilizando el constructo de vector de transformación binario descripto anteriormente por la transformación mediada por *Agrobacterium*, bien conocido en la técnica. Las células vegetales transformadas resultantes fueron inducidas a formar plantas de maíz enteras.

[00148] Se utilizó un análisis cualitativo y cuantitativo GUS para evaluar la actividad de los elementos de expresión en órganos y tejidos vegetales seleccionados en plantas transformadas. Para el análisis cualitativo de la expresión de GUS mediante tinción histoquímica, se incubaron tejidos de montaje entero o seccionados con una solución de tinción GUS que contenía 1 mg/ml de X-Gluc (5–bromo–4–cloro–3–indolil–b–glucurónido) durante 5 h a 37 °C y se decoloró con EtOH al 35 % y ácido acético al 50 %. La expresión de GUS se determinó cualitativamente mediante la inspección visual de órganos o tejidos vegetales seleccionados para la coloración azul bajo un microscopio de disección o compuesto.

[00149] Para el análisis cuantitativo de la expresión de GUS mediante ensayos enzimáticos, se extrajo proteína total de tejidos seleccionados de plantas de maíz transformadas. Se incluyeron de uno a dos microgramos de proteína total con el sustrato fluorogénico, 4–metileumbeliferil–ß –D–glucurónido (MUG) a una concentración de 1 mM en un volumen total de reacción de 50 microlitros. Después de 1 h de incubación a 37 ° C, la reacción se detuvo agregando 350 microlitros de solución de bicarato de sodio de 200 mM. El producto de reacción, 4-metlyumbelliferone (4-MU), es fluorescente máximo a pH alto, donde el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de la solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente 4-MU. La cantidad de 4-MU formada se estimó midiendo su fluorescencia utilizando un lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG LABTECH) (excitación a 355 nm, emisión a 460 nm). Los valores de actividad de GUS se proporcionan en nmoles de proteína total 4-MU/hour/mg.

[00150] Se tomaron muestras de los siguientes tejidos para la expresión de GUS en la generación R_0: hoja y raíz en estadio V4; V7 etapa Hoja y Raíz; Etapa VT Hoja, polen, Espiguilla y Tallo/entrenudo; R1 etapa Mazorca/Seda; y la semilla de la etapa R3 21 días después de la polinización (DDP). La Tabla 5 muestra la expresión cuantitativa media de GUS para los tejidos muestreados donde "bdl" indica debajo del nivel de detección.

Tabla 5. Expresión media GUS de plantas de maíz transformadas de forma estable.

		EXP-SETit.Spo11/T-SETit.Spo11		EXP-SETit.Spo11/T-SACra.Hsp16.9	
Etapa	**Órgano**	**Rango**	**Medio**	**Rango**	**Medio**
V4	Hoja	21 - 77,62	38,01	20,61 - 156,72	56,04
	Raíz	24,64 - 60,45	39,56	24,07 - 95,57	47,71
V7	Hoja	20,18 - 31,9	25,85	22,5 - 56,68	35,84
	Raíz	25,69 - 123,56	43,57	26,88 - 101,49	46,56
VT	Hoja	20,28 - 51,39	29,77	-	-
	Polen	20,69 - 256,61	120,11	30,82 - 517,76	234,6
	Espiguilla	22,48 - 61,23	38,96	29,98 - 184,44	88,03
	Tallo/entrenudo	Bdl	Bdl	20,97 - 24,31	22,47
R1	Mazorca/seda	20,49 - 71,17	27,98	21,12 - 44,57	27,88
R3	Semilla 21DDP	26,5 - 113,07	50,97	20,02 - 361,73	67,63

[00151] Como se puede ver en la Tabla 5 anterior, EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO: 10) fue capaz de impulsar la expresión GUS en la mayoría de los tejidos de la muestra cuando se vinculó operativamente a cualquiera de las 3' UTR, T-SETvi.SPO11-1: 1 (SEQ ID NO: 14) o T-SACra.Hsp16.9: 29 (SEQ ID NO: 15). La expresión fue más alta en VT Polen y Espiguilla. La tinción de espiguillas VT de múltiples eventos mostró que la expresión estaba aislada al polen dentro de la espiguilla no madura. El patrón de expresión conferido por EXP-SETvi.SPO11-1_Eef7 (SEQ ID NO: 10) fue similar en cualquiera de las dos 3' UTR, T-SETvi.SPO11-1:1 (SEQ ID NO:14) o T-SACra.Hsp16.9:29 (SEQ ID NO:15), pero la expresión fue casi 2 veces mayor en VT Polen y casi 2,3 veces mayor en VT Espiguilla usando T-SACra.Hsp16.9:29 en comparación con T-SETvi.SPO11-1:1.

Ejemplo 6
Ensayo de la actividad de mejora mediada por intrón de I-Zm.GSI85.nno:1 en plantas de maíz transformadas de forma estable

[00152] Las plantas de maíz se transformaron con constructos de ADN recombinante, específicamente constructos de transformación de plantas, que comprenden un promotor constitutivo vinculado operativamente al intrón, I-Zm.GSI85.nno: 1 (SEQ ID NO: 8) que impulsa la expresión de un gen trans ß–glucuronidasa (GUS)y se compara con plantas que expresan GUS impulsadas por el mismo promotor pero que carecen del intrón para evaluar el efecto de mejora de la expresión del intrón.

[00153] Las plantas de maíz se transformaron con dos constructos de expresión GUS de plantas, un constructo de control y un constructo experimental, que se construyeron utilizando métodos conocidos en la técnica. Ambas constructos contenían una región del borde izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete de selección de transgenes utilizado para la selección de células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato, un segundo casete transgénico utilizado para evaluar la actividad de mejora impartida por el intrón, I-Zm.GSI85.nno:1 (SEQ ID NO: 8), y una región de borde derecho de *Agrobacterium tumefaciens*. El segundo casete transgénico de la estructura c de controlcomprendía un promotor constitutivo de baja expresión y un líder vinculado operativamente 5' a una secuencia codificante para GUS compuesta por un intrón procesable (SEQ ID NO: 18), vinculado operativamente 5' a una 3' UTR. El segundo casete transgénico de la constitución experimental comprendía el mismo promotor, líder, secuencia codificante GUS y la región 3' UTR control del constructo e incluía el intrón, I-Zm.GSI85.nno:1, vinculado operativamente 3' al líder y 5' a la secuencia codificante GUS.

[00154] Las células vegetales de maíz se transformaron utilizando el constructo de vector de transformación binario descripto anteriormente por la transformación mediada por *Agrobacterium*, como es bien sabido en la técnica. Las células vegetales transformadas resultantes fueron inducidas a formar plantas de maíz enteras.

[00155] La expresión cualitativa y cuantitativa GUS se evaluó como se describiera anteriormente en el ejemplo 5. Se tomaron muestras de los siguientes tejidos para la expresión GUS en la generación R_0: hoja y raíz en estadio V4; V7 etapa Hoja y Raíz; Etapa VT Flor / anteras, Hoja y Raíz; R_1 etapa Mazorca/Seda; y Embrión de semilla y endosperma en etapa R_3 21 días después de la polinización (DDP). La Tabla 6 muestra la expresión cuantitativa media GUS para los tejidos de la muestra, donde "bdl" indica - según las siglas en inglés - por debajo del nivel de detección.

Tabla 6. Expresión media GUS de plantas de maíz transformadas de forma estable.

Etapa	Órgano	Sin GSI85	Con GSI85
V4	Hoja	Bdl	217,61
	Raíz	10,47	19,93
V7	Hoja	13,29	Bdl
	Raíz	Bdl	Bdl
VT	Flor/anteras	11,16	40,06
	Hoja	Bdl	26,14
	Raíz	12,45	Bdl
R1	Mazorca/seda	13,15	Bdl

R3	Embrión de semilla 21 DAP	Bdl	77,6
	Semilla Endospermo 21 DAP	Bdl	19,61

[00156] Como se puede ver en la Tabla 6 anterior, la adición del intrón, I-Zm.GSI85.nno:1 aumentó la expresión en varios tejidos. La mayor mejora de la expresión se observó en la hoja V4 y el embrión de semilla 21 días después de la polinización. La expresión también se mejoró en VT Flores/anteras y Hojas. El intrón, I-Zm.GSI85.nno:1 (SEQ ID NO: 8) proporciona una mejora mediada por intrón cuando se vincula operativamente a un promotor en un casete de expresión.

FORMAS DE REALIZACIÓN

[00157] Para una mayor ilustración, a continuación se exponen otras formas de realización no limitativas de la presente invención.

[00158] La forma de realización 1 es un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia reguladora de ADN que comprende:

a. una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de los SEQ ID NO:1-15;
b. una secuencia que comprende cualquiera de los SEQ ID NO:1-15; y
c. un fragmento de (i) cualquiera de los SEQ ID NO:1-15 o (ii) cualquier secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de los SEQ ID NO:1-15, donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes;

donde dicha secuencia reguladora de ADN está vinculada operativamente a una secuencia de ADN transcribible heteróloga que codifica una recombinasa sitio-específica.

[00159] La forma de realización 2 es el constructo de ADN recombinante de la forma de realización 1, en la que dicha secuencia reguladora de ADN tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia a la secuencia de ADN con respecto a cualquiera de los SEQ ID NO: 1-15.

[00160] La forma de realización 3 es el constructo de ADN recombinante de la forma de realización 1 o 2, en la que dicha secuencia reguladora de ADN tiene al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ADN de cualquiera de los SEQ ID NO: 1-15.

[00161] La forma de realización 4 es el constructo de ADN recombinante de las formas de realización 1, 2 o 3 en la que dicha secuencia reguladora del ADN tiene actividad reguladora de genes.

[00162] La forma de realización 5 es el constructo de ADN recombinante de cualquiera de las formas de realización 1- 4, en la que dicha recombinasa sitio-específica se selecciona del grupo formado por una Cre-recombinasa, una Flp-recombinasa, una R-recombinasa y una Gin-Recombinasa.

[00163] La forma de realización 6 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-5, en la que dicha recombinasa sitio-específica es una Cre-recombinasa.

[00164] La forma de realización 7 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-6, que comprende además uno o ambos de los siguientes casetes de expresión: un transgén marcador seleccionable; y/o un transgén de interés agronómico.

[00165] La forma de realización 8 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-7, que además comprende un par de secuencias de sitios de recombinación específicos del sitio que flanquean una o ambas secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica y / o el transgén marcador seleccionable, en el que los sitios de recombinación específicos del sitio pueden ser escindidos por la recombinasa específica del sitio.

[00166] La forma de realización 9 es el constructo de ADN recombinante de la forma de realización 8, en la que dicho par de secuencias de sitios de recombinación específicos del sitio están orientadas en una disposición de cabeza a cola.

[00167] La forma de realización 10 es el constructo de ADN recombinante de la forma de realización 8 o 9, en la que dicho transgén marcador seleccionable confiere resistencia a un herbicida o un antibiótico.

[00168] La forma de realización 11 es el constructo de ADN recombinante de cualquiera de las formas de realización 8, 9 o 10, en la que dicho par de recombinaciones sitio-específicas en secuencias del sitio se seleccionan del grupo formado por LoxP, FRT, RS y GIX.

[00169] La forma de realización 12 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 7-11, o de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 8-11, donde dicho par de secuencias de recombinación sitio-específicas son cada una una LoxP.

[00170] La forma de realización 13 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 7-12, o de cualquiera de las formas de realización 8-12, donde dicho par de secuencias de sitios de recombinación sitio-específicas comprenden cada una SEQ ID NO: 20.

[00171] La forma de realización 14 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 7-13, donde dicho transgén de interés agronómico confiere tolerancia a herbicidas en las plantas.

[00172] La forma de realización 15 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 7-13, donde dicho transgén de interés agronómico confiere resistencia a plagas o enfermedades en las plantas.

[00173] La forma de realización 16 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 7-13, donde dicho transgén de interés agronómico confiere un mayor rendimiento o tolerancia al estrés en las plantas.

[00174] La forma de realización 17 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 7-16, donde dicho transgén de interés agronómico codifica un ARNbc, un miARN o un ARN interferente.

[00175] La forma de realización 18 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-17, que comprende además una o ambas de los siguientes: un casete de expresión que codifica un ARN guía; y/o un casete de expresión que codifica una nucleasa sitio-específica.

[00176] La forma de realización 19 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con la forma de realización 18, que comprende además un par de secuencias de sitios de recombinación específicos del sitio que flanquean una o más de las secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica, el transgén marcador seleccionable, el casete de expresión que codifica el ARN guía y / o el casete de expresión que codifica la nucleasa sitio-

específica, donde los sitios de recombinación específicos del sitio pueden ser escindidos por la recombinasa sitio-específica.

[00177] La forma de realización 20 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con las formas de realización 18 o 19, donde ARN guía comprende una secuencia dirigida que tiene por objetivo una secuencia en el genoma de una célula eucariota para la edición del genoma o la integración sitio-específica.

[00178] La forma de realización 21 es el constructo de ADN recombinante de la forma de realización 20, donde dicha célula eucariota es una célula vegetal.

[00179] La forma de realización 22 es el constructo de ADN recombinante de cualquiera de las formas de realización 18-21, que comprende dos o más casetes de expresión que codifican dos o más ARN guía.

[00180] La forma de realización 23 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 18-22, donde hay dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez casetes de expresión diferentes que codifican al ARN guía.

[00181] La forma de realización 24 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 18-23, donde dicha nucleasa sitio-específica es una endonucleasa guiada por ARN.

[00182] La forma de realización 25 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con las formas de realización 18-24, donde dicha endonucleasa guiada por ARN se selecciona del grupo formado por Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9, Cas10, Cas12a, Cys1, Cys2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, CasX y CasY.

[00183] La forma de realización 26 es el constructo de ADN recombinante de la forma de realización 25, mientras que dicha endonucleasa guiada por ARN es Cas9 o Cas12a.

[00184] La forma de realización 27 es una molécula o vector de ADN que comprende dicho constructo de ADN recombinante de cualquiera de las formas de realización 1-26.

[00185] La forma de realización 28 es un vector de transformación de ADN que comprende el constructo de ADN recombinante de cualquiera de las formas de realización 1-26 y un segmento de ADN-T limitado por un borde izquierdo y un borde derecho.

[00186] La forma de realización 29 es el vector de transformación del ADN de la forma de realización 28, donde la secuencia de ADN transcribible que codifica la recombinasa sitio-específica se encuentra entre el borde izquierdo y el borde derecho del segmento de ADN-T.

[00187] La forma de realización 30 es un vector de transformación de ADN que comprende el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 7-26 y un segmento de ADN-T con un borde izquierdo y un borde derecho, donde una o más de las secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica, el transgén marcador seleccionable y / o el transgén de interés agronómico se encuentran entre el borde izquierdo y el borde derecho del segmento de ADN-T.

[00188] La forma de realización 31 es el vector de transformación DN A que comprende el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 18-26 y un segmento de ADN-T con un borde izquierdo y un borde derecho, donde una o más de las secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica, el transgén marcador local, el transgén de interés agronómico, el casete de expresión que codifica el ARN guía y/o el casete de expresión que codifica la nucleasa sitio-específica se encuentran entre el borde izquierdo y el borde derecho del segmento ADN-T.

[00189] La forma de realización 32 es una planta, parte de una planta o célula vegetal transgénica que comprende el constructo de ADN recombinante de cualquiera de las formas de realización 1-26.

[00190] La forma de realización 33 es la planta transgénica, la parte de una planta o célula vegetal de acuerdo con la forma de realización 32, donde dicho constructo ADN recombinante se transforma de manera estable en el genoma de dicha planta, parte de la planta o célula vegetal transgénica.

[00191] La forma de realización 34 es la planta, parte de la planta o célula vegetal transgénica de acuerdo con la forma de realización 32 o 33, en la que dicha planta, parte de la planta o célula

vegetal transgénica es una planta de maíz, soja, algodón o canola, parte de la planta o célula vegetal.

[00192] La forma de realización 35 es una célula bacteriana que comprende el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1-26, la molécula de ADN o vector de la forma de realización 27, o el vector de transformación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 28-31.

[00193] La forma de realización 36 es un método para producir una planta o parte de una planta transgénica, que comprende:

a. transformar una célula vegetal de un explante con una molécula o vector de ADN que comprenda el constructo de ADN recombinante de cualquiera de las formas de realización 1-25 o cualquiera de las formas de realización 1-26 para producir una o más células vegetales transformadas que comprendan el constructo de ADN recombinante transformadas de forma estable en el genoma de una o más células vegetales transformadas;
b. regenerar o desarrollar una planta transgénica a partir del explante, donde la planta transgénica comprende el constructo de ADN recombinante transformado de manera estable en el genoma de una o más células de la planta transgénica.

[00194] La forma de realización 37 es el método de la forma de realización 36, donde dicha célula vegetal se transforma a través de la transformación mediada por *Agrobacterium* o la transformación mediada por *Rhizobium*.

[00195] La forma de realización 38 es el método de forma de realización 36, donde dicha célula vegetal se transforma a través de la transformación mediada por microproyectiles o la transformación mediada por bombardeo de partículas.

[00196] La forma de realización 39 es el método de la forma de realización 36, donde dicha planta transgénica y célula vegetal es una planta de maíz, soja, algodón o canola y una célula vegetal, respectivamente.

[00197] La forma de realización 40 es el método de acuerdo con la forma de realización 36, que comprende además:

c. separar o cosechar una parte de la planta transgénica.

[00198] La forma de realización 41 es un método para extirpar un casete de expresión del genoma de una planta transgénica, que comprende:

a. transformar una célula vegetal con una molécula o vector de ADN que comprenda el constructo de ADN recombinante de cualquiera de las formas de realización 8-24 para producir una o más células vegetales transformadas que comprendan el constructo de ADN recombinante transformadas de forma estable en el genoma de una o más células vegetales transformadas;
b. regenerar o desarrollar una planta transgénica, al menos en parte, a partir de una o más células vegetales transformadas de forma estable;
c. cruzar la planta transgénica consigo misma o con otra planta; y
d. seleccionar una o más plantas de progenie en las que se extirpan una o ambas secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica y/o el gen marcador seleccionable entre el par de secuencias del sitio derecombinación sitio-específicas del constructo de ADN recombinante y ya no están presentes en el genoma de las plantas de la progenie.

[00199] La forma de realización 42 es el método de acuerdo con la forma de realización 41,

donde dicho constructo de ADN recombinante comprende además uno o ambos de los siguientes casetes de expresión entre el par de secuencias de sitios de recombinación específicos del sitio de ADN del constructo de ADN recombinante: un casete de expresión que codifica un ARN guía y/o un casete de expresión que codifica una nucleasa sitio-específica, y

donde se seleccionan una o más plantas progenie donde se extirpan una o más de las secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica, el transgén marcador seleccionable, el casete de expresión que codifica el ARN guía y / o el casete de expresión que codifica la nucleasa sitio-específica de dicho constructo de ADN recombinante y ya no están presentes en el genoma de las plantas de progenie.

[00200] La forma de realización 43 es el método de forma de realización 41, donde dicha planta transgénica y célula vegetal son de una planta de maíz, soja, algodón o canola y una célula vegetal, respectivamente.

[00201] La forma de realización 44 es el método de la forma de realización 41, que comprende además:

e. Separar o cosechar una parte de la planta de una o más de las plantas de progenie.

[00202] La forma de realización 45 es el método de la forma de realización 41, que comprende además:

f. cruzar una o más de las plantas de la progenie consigomisma o con otra planta.

[00203] La forma de realización 46 es un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en:

d. una secuencia con al menos un 85 por ciento de identidad con respecto a cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14;
e. una secuencia que comprende cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14; y
f. un fragmento de cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14, donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes;

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

[00204] La forma de realización 47 es el constructo de ADN recombinante de la forma de realización 46, donde dicha secuencia tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14.

[00205] La forma de realización 48 es el constructo de ADN recombinante de la forma de realización 46 o 47, donde dicha secuencia tiene al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14.

[00206] La forma de realización 49 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con las formas de realización 46, 47 o 48, donde la secuencia de ADN comprende la actividad reguladora de genes.

[00207] La forma de realización 50 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con la forma de realización 46, donde la molécula de ADN transcribible heteróloga comprende un gen de interés agronómico.

[00208] La forma de realización 51 es el constructo de ADN recombinante de la forma de realización 50, donde el gen de interés agronómico confiere tolerancia a herbicidas en las plantas.

[00209] La forma de realización 52 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con la forma de realización 50, donde el gen de interés agronómico confiere resistencia a las plagas en las plantas.

[00210] La forma de realización 53 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con la forma de realización 46, donde la molécula de ADN transcribible heteróloga codifica un ARNbc, un miARN o un ARN interferente.

[00211] La forma de realización 54 es una célula vegetal transgénica que comprende un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

g. una secuencia con al menos un 85 por ciento de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14;
h. una secuencia que comprende cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14; y
i. un fragmento de cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14, donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes;

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

[00212] La forma de realización 55 es la célula vegetal transgénica de la forma de realización 54, donde dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal monocotiledónea.

[00213] La forma de realización 56 es la célula vegetal transgénica de la forma de realización 54, donde dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal dicotiledónea.

[00214] La forma de realización 57 es una planta transgénica, o parte de ella, que comprende el constructo de ADN recombinante de la forma de realización 46.

[00215] La forma de realización 58 es una planta progenie de la planta transgénica de la forma de realización 57, o una parte de la misma, donde la planta de progenie o parte de la misma comprende dichao constructo de ADN recombinante.

[00216] La forma de realización 59 es una semilla transgénica, donde la semilla comprende el constructo de ADN recombinante de la forma de realización 46.

[00217] La forma de realización 60 es un método de producción de un commodity que comprende la obtención de una planta transgénica o parte de ella de acuerdo con la forma de realización 57.

[00218] La forma de realización 61 es el método de la forma de realización 60, donde el commodity consiste en semillas, semillas procesadas, concentrado de proteína, aislado de proteína, almidón, granos, partes de plantas, aceite de semilla, biomasa, y harina.

[00219] La forma de realización 62 es un método de expresión de un ADN transcripto que comprende la obtención de una planta transgénica de acuerdo con la forma de realización 57 y la planta de cultivo, donde se expresa el ADN transcribible.

[00220] La forma de realización 63 es una secuencia codificante Cre-recombinasa con al menos un 90% de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO:17.

[00221] La forma de realización 64 es la secuencia codificante Cre-recombinasa de la forma de realización 63 con al menos un 95% de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO:17.

[00222] La forma de realización 65 es la secuencia codificante Cre-recombinasa de la forma de realización 63 o 64 con al menos un 99% de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO: 17.

[00223] La forma de realización 66 es el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 36-38, donde dicha planta transgénica y célula vegetal son de una planta de maíz, soja, algodón o canola, respectivamente.

[00224] La forma de realización 67 es el método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 36-39, que además comprende:

d. separar o cosechar una parte de la planta transgénica.

[00225] La forma de realización 68 es el método de la forma de realización 41 o 42, donde dicha planta transgénica y célula vegetal son de una planta de maíz, soja, algodón o canola, respectivamente.

[00226] La forma de realización 69 es el método de cualquiera de las formas de realización 41-43, que además comprende:

f. Separar o cosechar una parte de la planta de una o más de las plantas de progenie.

[00227] La forma de realización 70 es el método de cualquiera de las formas de realización 41-44, que además comprende:

g. cruzar una o más de las plantas de progenie consigo misma o con otra planta.

[00228] La forma de realización 71 es una planta transgénica, o parte de ella, que comprende el constructo de ADN recombinante de cualquiera de las formas de realización 46-49.

[00229] La forma de realización 72 es una planta progenie de la planta transgénica de la forma de realización 57 o 71, o una parte de la misma, donde la planta de progenie o parte de la misma comprende el constructo de ADN recombinante de cualquiera de las formas de realización 46-49.

[00230] La forma de realización 73 es un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en:

j. una secuencia con al menos un 85 por ciento de identidad con respecto a cualquiera de los SEQ ID NO: 1-15;
k. una secuencia que comprende cualquiera de los SEQ ID NO:1-15; y
l. un fragmento de cualquiera de los SEQ ID NO: 1-15, donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes;

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

[00231] La forma de realización 74 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con la forma de realización 73, donde dicha secuencia tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ADN de los SEQ ID NO: 1-15.

[00232] La forma de realización 75 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con la forma de realización 73 o 74, donde dicha secuencia tiene al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ADN de los SEQ ID NO: 1-15.

[00233] La forma de realización 76 es el constructo de ADN recombinante de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 73-75, donde la secuencia de ADN comprende la actividad reguladora de genes.

[0200] Habiendo ilustrado y descripto los principios de la presente invención, deberá resultar evidente para las personas expertas en la técnica que la invención puede ser modificada en disposición y detalle sin apartarse de tales principios. Reivindicamos todas las modificaciones que están dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones. Todas las publicaciones y documentos de patente publicados que han sido citados en el presente documento se incorporan a modo de referencia en la misma medida en que cada publicación individual o solicitud de patente se haya indicado específica e individualmente como incorporada a modo de referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia reguladora del ADN que comprende:

a. una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de los SEQ ID NO:1-15;

b. una secuencia que comprenda cualquiera de los SEQ ID NO: 1-15; y

c. un fragmento de (i) cualquiera de los SEQ ID NO:1-15 o (ii) cualquier secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia a cualquiera de los SEQ ID NO:1-15, donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes;

donde dicha secuencia reguladora de ADN está vinculada operativamente a una secuencia de ADN transcribible heteróloga que codifica una recombinasa sitio-específica.

2. El constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque:

a. dicha secuencia reguladora de ADN tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ADN de cualquiera de los SEQ ID NO:1-15;

b. dicha secuencia reguladora de ADN tiene al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ADN de cualquiera de los SEQ ID NO: 1-15;

c. dicha secuencia reguladora del ADN tiene actividad reguladora de genes;

d. dicha recombinasa sitio-específica se selecciona del grupo formado por una Cre-recombinasa, una Flp-recombinasa, una R-recombinasa y una Gin-Recombinasa;

e. dicha recombinasa sitio-específica es una Cre-recombinasa;

f. el constructo de ADN recombinante comprende además uno o ambos de los siguientes casetes de expresión: un transgén marcador seleccionable; y/or un transgén de interés agronómico;

g. el constructo de ADN recombinante comprende además un par de secuencias de sitio de recombinación sitio-específicas que flanquean una o ambas secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica y/o el transgén marcador

seleccionable, donde los sitios de recombinación sitio-específica del pueden ser escindidos por la recombinasa sitio-específica; o

h. el constructo de ADN recombinante comprende además uno o ambos de los siguientes: un casete de expresión que codifica un ARN guía; y/o un casete de expresión que codifica una nucleasa sitio-específica.

3. El constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque:

a. dicho par de secuencias de sitios de recombinación sitio- específica están orientadas con una disposición de cabeza-a-cola;

b. dicho transgén marcador seleccionable confiere resistencia a un herbicida o antibiótico;

c. dicho par de secuencias de sitios de recombinación sitio- específica se seleccionan del grupo que consiste en LoxP, FRT, RS y GIX;

d. dicho par de secuencias de sitios de recombinación sitio- específica son cada uno un LoxP;

e. dicho par de secuencias de sitios de recombinación sitio- específica comprenden cada una el SEQ ID NO: 20;

f. dicho transgén de interés agronómico confiere tolerancia herbicida en plantas;

g. dicho transgén de interés agronómico confiere resistencia a plagas o enfermedades en las plantas;

h. dicho transgén de interés agronómico confiere un aumento del rendimiento o tolerancia al estrés en plantas;

i. dicho transgén de interés agronómico codifica un ARNbc, un miARN o un ARN interferente;

j. el constructo de ADN recombinante comprende además un par de secuencias de sitios de recombinación sitio-específica del que flanquean una o más de las secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica, el transgén marcador seleccionable, el casete de expresión que codifica el ARN guía y/o el casete de expresión que codifica la nucleasa sitio-específica, donde los sitios iónicos recombinantes sitio-específicos pueden ser escindidos por la recombinasa sitio-específica;

k. dicho ARN guía comprende una secuencia dirigida que tiene por objetivo una secuencia en el genoma de una célula eucariota para la edición del genoma o la integración sitio-específica;

l. el constructo de ADN recombinante comprende dos o más casetes de expresión que codifican dos o más ARN guía;

m. el constructo del ADN recombinante comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez casetes de expresión diferentes que codifican el ARN guía;

n. dicha nucleasa sitio-específica es una endonucleasa guiada por ARN;

o. dicha endonucleasa guiada por ARN se selecciona del grupo formado por Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9, Cas10, Cas12a, Cys1, Cys2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm 6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2,Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, CasX y CasY.

4. El constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizada porque:

a. dicha célula eucariota es una célula vegetal; o

b. dicha endonucleasa guiada por ARN es Cas9 o Cas12a.

5. Una molécula de ADN, vector de ADN o vector de transformación de ADN que comprende:

a. dicho constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1; o

b. dicho constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 y un segmento de ADN-T delimitado por un borde izquierdo y un borde derecho.

6. El vector de transformación de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque dicha secuencia de ADN transcribible que codifica la recombinasa sitio-especifica se encuentra entre el borde izquierdo y el borde derecho del segmento de ADN-T.

7. Un vector de transformación de ADN que comprende el constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, y un segmento de ADN-T con un borde izquierdo y un borde derecho, caracterizado porque:

a. una o más de las secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica, el transgen marcador seleccionable y/o el transgén de interés agronómico se encuentran entre el borde izquierdo y el borde derecho del segmento de ADN-T, o

b. una o más de las secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica, el marcador seleccionable transgénico, el transgén de interés agronómico, el casete de expresión que codifica el ARN guía y/o el casete de expresión que codifica la nucleasa sitio-específica se encuentran entre el borde izquierdo y el borde derecho del segmento de ADN-T.

8. Una planta, parte de una planta o célula vegetal transgénica , o una célula bacteriana que comprende dicha constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1.

9. La planta, parte de una planta o célula vegetal transgénica de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada porque:

a. dicho constructo de ADN recombinante se transforma de manera estable en el genoma de la planta, parte de la planta o célula vegetal transgénica; o

b. dicha planta, parte de la planta o célula vegetal transgénica es una planta, parte de una planta o célula vegetal de maíz, soja, algodón o canola.

10. Un método para producir una planta transgénica o parte de una planta, que comprende:

a. transformar una célula vegetal de un explante con una molécula o vector de ADN que comprende l constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 para producir una o más células vegetales transformadas que comprenden el constructo de ADN recombinante transformadas de manera estable en el genoma de una o más células vegetales transformadas ; y

b. regenerar o desarrollar una planta transgénica a partir del explante, caracterizado porque la planta transgénica comprende el constructo de ADN recombinante transformado de manera estable en el genoma de una o más células de la planta transgénica.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque:

a. dicha célula vegetal se transforma a través de la transformación mediada por *Agrobacterium* o la transformación mediada por *Rhizobium*;

b. dicha célula vegetal se transforma mediante transformación mediada por microproyectiles o formación de partículas mediada por bombardeo;

c. dicha planta transgénica y célula vegetal son una planta de maíz, soja, algodón o canola y una célula vegetal, respectivamente; o

d. el método comprende además: separar o cosechar una parte de la planta transgénica.

12. Un método para extirpar un casete de extracción del genoma de una planta transgénica, que comprende:

a. transformar una célula vegetal con una molécula o vector de ADN que comprende el constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 2 para producir una o más células vegetales transformadas que comprendan el constructo de ADN recombinante transformado en forma estable en el genoma de una o más células vegetales transformadas;

b. regenerar o desarrollar una planta transgénica, al menos en parte, a partir de una o más células vegetales transformadas de forma estable;

c. cruzar la planta transgénica consigo misma o con otra planta; y

d. seleccionar una o más plantas de progenie en las que una o ambas secuencias de ADN transcribibles que codifican la recombinasa sitio-específica y/o el transgén marcador seleccionable entre el par de secuencias del sitio de la recombinación sitio-específica del constructo de ADN recombinante se extirpen y ya no estén presentes en el genoma de las plantas de la progenie.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque:

a. dicho constructo de ADN recombinante comprende además uno o ambos de los siguientes casetes de expresión entre el par de secuencias de sitios de recombinación sitio-específica del ADN del constructo de ADN recombinante: un casete de expresión que codifica un ARN guía y/o un casete de expresión que codifica una nucleasa sitio-

específica, y donde se seleccionan una o más plantas de progenie en las que una o más de las secuencias de ADN transcribible que codifica la recombinasa sitio-específica, el transgén marcador seleccionable, el casete de expresión que codifica el ARN guía y/o el casete de expresión que codifica la nucleasa sitio-específica de dicho constructo de ADN recombinante son extirpados y ya no están presentes en el genoma de las plantas de la progenie;

b. dicha planta transgénica y célula vegetal son una planta de maíz, soja, algodón o canola y una célula vegetal, respectivamente;

c. el método comprende además: separar o cosechar una parte de una o más plantas de la progenie; o

d. el método comprende además: cruzar una o más de las plantas de la progenie consigo misma o con otra planta.

14. Un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo formado por:

a. una secuencia con al menos un 85 por ciento de identidad con respecto a cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14;

b. una secuencia que comprenda cualquiera de los SEQ ID NO:8, 10, 11, 12 y 14; y

c. un fragmento de cualquiera de los SEQ ID NO:8, 10, 11, 12 y 14, donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes;

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

15. El constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizada porque:

a. dicha secuencia tiene al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ADN de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14;

b. dicha secuencia tiene al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de ADN de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14;

c. la secuencia de ADN comprende la actividad reguladora de genes;

d. la molécula de ADN transcribible heteróloga comprende un gen de interés agronómico, o

e. la molécula de ADN transcribible heteróloga codifica un ARNbc, un miARN o un ARN interferente.

16. El constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizada porque:

a. el gen de interés agronómico confiere tolerancia a herbicidas en las plantas; o

b. El gen de interés agronómico confiere resistencia a plagas en las plantas.

17. Una célula vegetal transgénica que comprende un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por:

a. una secuencia con al menos un 85 por ciento de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14;

b. una secuencia que comprende cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14; y

c. un fragmento de cualquiera de los SEQ ID NO: 8, 10, 11, 12 y 14, donde el fragmento tiene actividad reguladora de genes;

donde dicha secuencia está vinculada operativamente a un móculo heterólogo transcribible de ADN.

18. La célula vegetal transgénica de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizada porque:

a. dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal monocotiledónea; o

b. dicha célula vegetal transgénica es una célula vegetal dicotiledónea.

19. Una planta transgénica o parte de una planta, semilla de planta transgénica, o planta progenie o parte de una planta, que comprende el constructo de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 14.

20. Un método de producción de un commodity que comprende la obtención de una planta transgénica o parte de ella de acuerdo con la reivindicación 19.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizado porque la commodity consiste en semillas, semillas procesadas, concentrado de proteína, aislado de proteína, almidón, granos, partes de plantas, aceite de semilla, biomasa, harina y sémola.

22. Un método de expresar un constructo de ADN transcribible que comprende la obtención de una planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 19 y el cultivo de dicha planta, caracterizado porque se expresa el ADN transcripto.

23. Una secuencia codificante Cre-recombinasa, dicha secuencia tiene:

a. al menos el 90% de la identidad de secuencia con respecto al SEQ ID NO:17.

b. al menos el 95% de la identidad de secuencia con respecto al SEQ ID NO:17; o

c. al menos el 99% de la identidad de secuencia con respecto al SEQ ID NO:17.

ELEMENTOS REGULADORES DE LAS PLANTAS

Y SUS USOS PARA LA AUTOESCISIÓN

RESUMEN

Se proveen moléculas y constructos de ADN recombinante que son útiles para modular la expresión génica en las plantas. Uno o más casetes de expresión de una molécula o constructo de ADN recombinante pueden extirparse de plantas transgénicas tras la transformación por la presencia de sitios de recombinación sitio-específica del flanqueante en la molécula de ADN recombinante o constructo por expresión de una enzima recombinasa codificada por la molécula o constructo de ADN recombinante. Dicho sistema de recombinasa podrá utilizarse para eliminar dicho casete de expresión de plantas transformadas con el constructo o vector de ADN recombinante. El transgén recombinasa puede estar vinculado operativamente a un promotor para la autoescisión en plantas transformadas sin cruzar a una línea transgénica diferente que exprese la recombinasa. También se proveen métodos para causar la autoescisión de uno o más casetes de expresión en una planta transgénica, y plantas y células que contienen o se transforman con una molécula de ADN recombinante o constructo de la presente revelación.