

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 882 425**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2011** **E 18212229 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.05.2021** **EP 3473722**

54 Título: **Elementos reguladores de plantas y usos de los mismos**

30 Prioridad:

14.01.2010 US 29516210 P

14.01.2010 US 29516010 P

26.02.2010 US 33905710 P

27.02.2010 US 30892110 P

27.02.2010 US 30891910 P

06.05.2010 US 33192410 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.12.2021

73 Titular/es:

MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)

800 North Lindbergh Boulevard

Saint Louis, MO 63167, US

72 Inventor/es:

FLASINSKI, STANISLAW;

DIETRICH, CHARLES;

WU, WEI;

LI, ZHAO LONG;

QIU, BO-XING;

GUO, LIANG y

CHITTOOR, JAISHREE, M.

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 882 425 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Elementos reguladores de plantas y usos de los mismos

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la biología molecular de las plantas y la ingeniería genética de plantas y moléculas de ADN útiles para modular la expresión génica en plantas y para especificar la localización intracelular o extracelular de un producto génico.

Antecedentes

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

Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevos elementos reguladores de genes para su uso en plantas. La presente invención también proporciona construcciones de ADN que comprenden los elementos reguladores. La presente invención también proporciona células vegetales transgénicas, plantas y semillas que comprenden los elementos reguladores, unidos operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible. La presente invención también proporciona procedimientos para fabricar y usar los elementos reguladores, las construcciones de ADN que comprenden los elementos reguladores y las células vegetales transgénicas, plantas y semillas que comprenden los elementos reguladores unidos operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en a) una secuencia con al menos 95 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 270 y que tiene actividad reguladora de genes; b) una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 270; en la que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible heteróloga. En determinadas realizaciones de la molécula de ADN, la secuencia de ADN comprende un elemento regulador. En algunas realizaciones, el elemento regulador comprende un promotor. En realizaciones particulares, la molécula polinucleotídica transcribible heteróloga comprende un gen de interés agronómico, un gen capaz de proporcionar resistencia a herbicidas en plantas o un gen capaz de proporcionar control de plagas vegetales en plantas.

La invención también proporciona una célula vegetal transgénica que comprende una construcción de ADN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en a) una secuencia con al menos 95 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 270 y que tiene actividad reguladora de genes; b) una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 270, en la que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible heteróloga. En determinadas realizaciones, la célula vegetal transgénica es una célula de una planta monocotiledónea. En otras realizaciones, la célula vegetal transgénica es una célula de una planta dicotiledónea.

También se incluye una planta transgénica, o parte de la misma, que comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en: a) una secuencia con al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 270 y que tiene actividad reguladora de genes; b) una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 270; y en el que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible heteróloga. En algunas realizaciones, se proporciona una planta descendiente de cualquier generación de dicha planta transgénica, o una parte de la misma. Además, también se proporciona una semilla transgénica, en la que la semilla comprende dicha molécula de ADN.

Breve descripción de las figuras

Las **FIGS. 1a-1c** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 24-25 para el promotor de actina 8 de mijo menor.

Las **FIGS. 2a-2c** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 28-29 para el promotor de Alcl de mijo menor.

Las **FIGS. 3a-3f** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 45-46 para el promotor de Cys de mijo menor.

Las **FIGS. 4a-4f** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 47-48 para el promotor de Dzs de mijo menor.

Las **FIGS. 5a-5c** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 58-59 para el promotor de Gst de mijo menor.

Las **FIGS. 6a-6C** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 60-61 para el promotor de lfr de mijo menor.

Las **FIGS. 7a-7d** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 64-65 para el promotor de Nrt2 de mijo menor.

Las **FIGS. 8a-8e** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 74-75 para el promotor de Ppc de mijo menor.

Las **FIGS. 9a-9f** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 82-83 para el promotor de Prx3 de mijo menor.

Las **FIGS. 10a-10f** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 88-91 para el promotor de Rcc3 de mijo menor.

Las **FIGS. 11a-11b** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 93-94 para el promotor de Ssp1 de mijo menor.

Las **FIGS. 12a-12d** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 96-97 para el promotor de Tip de mijo menor.

Las **FIGS. 13a-13d** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 98-99 para el promotor de TubA2-1 de mijo menor.

Las **FIGS. 14a-14c** representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NO: 102-103 para el promotor de Ubq1 de mijo menor.

La **FIG. 15** representa configuraciones de casete de transgén de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La invención desvelada en el presente documento proporciona moléculas polinucleotídicas que tienen actividad reguladora de genes beneficiosa u otra actividad del mijo menor, *Setaria italica*. El diseño, la construcción y el uso de estas moléculas polinucleotídicas son un objeto de la presente invención. Las secuencias de nucleótidos de estas moléculas polinucleotídicas son proporcionadas por la SEQ ID NO: 270. Estas moléculas polinucleotídicas son, por ejemplo, capaces de alterar la expresión de una molécula polinucleotídica transcribible unida operativamente en tejidos vegetales y, por lo tanto, pueden regular selectivamente la expresión génica o la actividad de un producto génico codificado, en plantas transgénicas. La presente invención también proporciona procedimientos para modificar, producir y usar las mismas. La invención también incluye composiciones, células huésped transformadas, plantas transgénicas y semillas que contienen los promotores y/u otras secuencias de nucleótidos de *S. italica* desveladas y procedimientos para preparar y usar las mismas.

Las siguientes definiciones y procedimientos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos en la materia en la práctica de la presente invención. A menos que se señale de otro modo, los términos deben entenderse según el uso convencional por los expertos en la materia relevante.

Moléculas de ADN

Como se usa en el presente documento, la expresión "ADN" o "molécula de ADN" se refiere a una molécula de ADN bicatenario de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases desoxirribonucleotídicas o una molécula polinucleotídica, leída desde el extremo 5' (cadena arriba) hasta el extremo 3' (cadena abajo). Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de ADN" se refiere a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN. La nomenclatura usada en el presente documento es la requerida por el Título 37 del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos § 1.822 y se expone en las tablas de la Norma ST.25 (1998) de la OMPI, apéndice 2, tablas 1 y 3.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ADN aislada" se refiere a una molécula de ADN separada al menos parcialmente de otras moléculas normalmente asociadas con ella en su estado nativo o natural. En una realización, el término "aislado" se refiere a una molécula de ADN que está al menos parcialmente separada de los ácidos nucleicos que normalmente flanquean la molécula de ADN en su estado nativo o natural. Por tanto, las moléculas de ADN fusionadas a secuencias reguladoras o codificantes con las que no se asocian normalmente, por ejemplo, como resultado de técnicas recombinantes, se consideran aisladas en el presente documento. Dichas moléculas se consideran aisladas incluso cuando se integran en el cromosoma de una célula huésped o están presentes en una solución de ácido nucleico con otras moléculas de ADN.

Se puede usar cualquiera de varios procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia para aislar y manipular una molécula de ADN, o un fragmento de la misma, desvelada en la presente invención. Por ejemplo, se puede usar la tecnología de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar una molécula de ADN de partida particular y/o para producir variantes de la molécula original. También se pueden obtener moléculas de ADN, o fragmento de las mismas, mediante otras técnicas tales como síntesis directa del fragmento por medios químicos, como se practica habitualmente usando un sintetizador de oligonucleótidos automático.

Como se usa en el presente documento, la expresión "identidad de secuencia" se refiere al grado en que dos secuencias polinucleotídicas alineadas de manera óptima o dos secuencias polipeptídicas alineadas de manera óptima son idénticas. Una alineación de secuencia óptima se crea manualmente alineando dos secuencias, p. ej., una secuencia de referencia y otra secuencia, para maximizar el número de correspondencias de nucleótidos en la alineación de la secuencia con inserciones, supresiones o huecos de nucleótidos internos adecuados. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia proporcionada como la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 270.

Como se usa en el presente documento, la expresión "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje de

identidad" o "% de identidad" es la fracción de identidad multiplicada por 100. La "fracción de identidad" para una secuencia alineada de manera óptima con una secuencia de referencia es el número de correspondencias de nucleótidos en el alineamiento óptimo, dividido por el número total de nucleótidos en la secuencia de referencia, p. ej., el número total de nucleótidos en la longitud completa de la secuencia de referencia completa. Por tanto, una realización de la invención es una molécula de ADN que comprende una secuencia que, cuando se alinea de manera óptima con una secuencia de referencia, proporcionada en el presente documento como las SEQ ID NO: 270, tiene aproximadamente 95 por ciento de identidad o más, o al menos 96 por ciento de identidad, 97 por ciento de identidad, 98 por ciento de identidad o 99 por ciento de identidad con la secuencia de referencia y tiene su actividad reguladora de genes.

10 Elementos reguladores

Un elemento regulador es una molécula de ADN que tiene actividad reguladora de genes, es decir, una que tiene la capacidad de alterar la transcripción y/o la traducción de una molécula polinucleotídica transcribible unida operativamente. La expresión "actividad reguladora de genes" se refiere por tanto a la capacidad de alterar el patrón de expresión de una molécula polinucleotídica transcribible unida operativamente alterando la transcripción y/o la traducción de esa molécula polinucleotídica transcribible unida operativamente. La actividad reguladora de genes puede ser positiva y/o negativa y el efecto puede caracterizarse por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo, tisulares, ambientales, fisiológicas, patológicas, de ciclo celular y/o químicamente sensibles, así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas.

Los elementos reguladores tales como promotores, líderes, intrones y regiones de terminación de la transcripción son moléculas de ADN que tienen una actividad reguladora de genes y desempeñan un papel integral en la expresión global de los genes en células vivas. La expresión "elemento regulador" se refiere a una molécula de ADN que tiene actividad reguladora de genes, es decir, una que tiene la capacidad de alterar la transcripción y/o la traducción de una molécula polinucleotídica transcribible unida operativamente. Los elementos reguladores aislados, tales como promotores y líderes, que actúan en las plantas son, por lo tanto, útiles para modificar los fenotipos de las plantas mediante los procedimientos de ingeniería genética.

Los elementos reguladores pueden caracterizarse por su patrón de expresión, es decir, como constitutivos y/o por su patrón de expresión temporal, espacial, de desarrollo, tisular, ambiental, fisiológico, patológico, de ciclo celular y/o químicamente sensible, y cualquier combinación de los mismos, así como mediante indicaciones cuantitativas o cualitativas. Un promotor es útil como elemento regulador para modular la expresión de una molécula polinucleotídica transcribible unida operativamente.

Como se usa en el presente documento, un "patrón de expresión génica" es cualquier patrón de transcripción de una molécula de ADN unida operativamente en una molécula de ARN transcrita. La expresión puede caracterizarse por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo, tisulares, ambientales, fisiológicas, patológicas, de ciclo celular y/o químicamente sensibles, así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas. La molécula de ARN transcrita puede traducirse para producir una molécula de proteína o puede proporcionar una molécula de ARN antisentido u otra reguladora, tal como un ARNbc, un ARNt, un ARNr, un miARN y similares.

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

Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere en general a una molécula de ADN que está implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa II y otras proteínas (factores de transcripción que actúan en *trans*) para iniciar la transcripción. Un promotor puede aislarse inicialmente de la región no traducida 5' (5' UTR) de una copia genómica de un gen. Como alternativa, los promotores pueden ser moléculas de ADN producidas o manipuladas sintéticamente. Los promotores pueden ser también quiméricos, es decir, un promotor producido mediante la fusión de dos o más moléculas de ADN heterólogas. Los promotores útiles en la práctica de la presente invención incluyen las SEQ ID NO: 23 a 105 y las SEQ ID NO: 353 a 536 o fragmentos o variantes de las mismas.

En una realización, se proporcionan fragmentos de una secuencia promotora desvelada en el presente documento. Los fragmentos promotores pueden presentar actividad promotora y pueden ser útiles solos o en combinación con otros promotores y fragmentos de promotores, tal como en la construcción de promotores quiméricos. En realizaciones específicas, se proporcionan fragmentos de un promotor que comprenden al menos aproximadamente 50, 95, 150, 250, 500 o aproximadamente 750 nucleótidos contiguos de una molécula polinucleotídica que tiene actividad promotora desvelada en el presente documento.

Un promotor o un fragmento de promotor también puede analizarse con respecto a la presencia de elementos promotores conocidos, es decir, las características de secuencias de ADN, tales como una secuencia TATA y otros motivos de sitios de unión de factores de transcripción conocidos. Un experto en la materia puede usar la identificación de dichos elementos promotores conocidos para diseñar variantes del promotor que tienen un patrón de expresión similar al del promotor original.

Como se usa en el presente documento, la expresión "potenciador" o "elemento potenciador" se refiere a un elemento regulador de la transcripción que actúa en *cis*, también conocido como elemento *cis*, que confiere un aspecto del modelo de expresión global, pero es habitualmente insuficiente solo para dirigir la transcripción, de una secuencia polinucleotídica unida operativamente. A diferencia de los promotores, los elementos potenciadores no incluyen habitualmente un sitio de inicio de la transcripción (TSS) o una secuencia TATA. Un promotor puede comprender de forma natural uno o más elementos potenciadores que alteran la transcripción de una secuencia polinucleotídica unida operativamente. Un elemento potenciador aislado puede también fusionarse con un promotor para producir un elemento promotor quimérico en *cis*, que confiere un aspecto de la modulación global de la expresión génica. Un promotor o fragmento de promotor puede comprender uno o más elementos potenciadores que alteran la transcripción de los genes unidos operativamente. Se cree que muchos elementos potenciadores promotores se unen a las proteínas de unión al ADN y/o alteran la topología del ADN, produciendo conformaciones locales que permiten o restringen selectivamente el acceso de la ARN polimerasa al molde de ADN o que facilitan la apertura selectiva de la doble hélice en el sitio de inicio de la transcripción. Un elemento potenciador puede actuar para unir los factores de transcripción que regulan la transcripción. Algunos elementos potenciadores se unen con más de un factor de transcripción, y los factores de transcripción pueden interactuar con diferentes afinidades con más de un dominio potenciador. Los elementos potenciadores pueden identificarse mediante varias técnicas, incluyendo el análisis de las supresiones, es decir la supresión de uno o más nucleótidos del extremo 5' o interno a un promotor; el análisis de las proteínas de unión al ADN usando la huella de la DNasa I, la interferencia de metilación, los ensayos de cambio de movilidad por electroforesis, la huella genómica *in vivo* mediante la PCR mediada por ligamiento, y otros ensayos convencionales; o mediante el análisis de similitud de secuencias de ADN utilizando motivos de elementos en *cis* conocidos o elementos potenciadores como una secuencia diana o un motivo diana con procedimientos de comparación de secuencias de ADN convencionales, tales como BLAST. La estructura fina de un dominio potenciador puede estudiarse adicionalmente mediante mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o mediante otros procedimientos convencionales. Los elementos potenciadores se pueden obtener mediante síntesis química o mediante el aislamiento de elementos reguladores que incluyen dichos elementos, y se pueden sintetizar con nucleótidos flanqueantes adicionales que contienen sitios útiles de enzimas de restricción para facilitar la manipulación de la subsecuencia. Por tanto, el diseño, la construcción y el uso de elementos potenciadores según los procedimientos desvelados en el presente documento para modular la expresión de moléculas polinucleotídicas transcribibles unidas operativamente están abarcados en la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "líder" se refiere a una molécula de ADN aislada de la región no traducida 5' (5' UTR) de una copia genómica de un gen y definida en general como un segmento de nucleótidos entre el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y el sitio de inicio de la secuencia codificante de la proteína. Como alternativa, los líderes pueden ser elementos de ADN producidos o manipulados sintéticamente. Se puede usar un líder como un elemento regulador 5' para modular la expresión de una molécula polinucleotídica transcribible unida operativamente. Las moléculas líder pueden usarse con un promotor heterólogo o con su promotor nativo. Las moléculas promotoras de la presente invención pueden por tanto estar unidas operativamente a su líder nativo o pueden estar unidas operativamente a un líder heterólogo. Los líderes útiles en la práctica de la presente invención incluyen las SEQ ID NO: 106 a 171 y las SEQ ID NO: 537 a 588 o fragmentos o variantes de las mismas.

Como se usa en el presente documento, el término "quimérico" se refiere a una única molécula de ADN producida mediante la fusión de una primera molécula de ADN con una segunda molécula de ADN, en la que ni la primera ni la segunda molécula de ADN se encontrarían normalmente en esa configuración, es decir, fusionada con la otra. La molécula de ADN quimérico es por tanto una nueva molécula de ADN que no se encuentra normalmente de otra forma en la naturaleza. Como se usa en el presente documento, la expresión "promotor quimérico" se refiere a un promotor producido mediante dicha manipulación de moléculas de ADN. Un promotor quimérico puede combinar dos o más fragmentos de ADN; un ejemplo sería la fusión de un promotor con un elemento potenciador. Por tanto, el diseño, la construcción y el uso de promotores quiméricos según los procedimientos desvelados en el presente documento para modular la expresión de moléculas polinucleotídicas transcribibles unidas operativamente están abarcados en la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a una segunda molécula de ADN que es de composición similar, pero no idéntica, a una primera molécula de ADN y, aun así, la segunda molécula de ADN aún mantiene la funcionalidad general, es decir, un patrón de expresión igual o similar, de la primera molécula de ADN. Una variante puede ser una versión más corta o truncada de la primera molécula de ADN y/o una versión alterada de la secuencia de la primera molécula de ADN, tal como una con diferentes sitios de enzimas de restricción y/o supresiones, sustituciones y/o inserciones internas. Una "variante" puede abarcar también un elemento regulador que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, supresión y/o inserción de uno o más nucleótidos de una secuencia de referencia, en la que el elemento regulador derivado tiene actividad de la transcripción o la traducción mayor o menor o equivalente a la molécula reguladora precursora correspondiente. Las "variantes" de elementos reguladores abarcarán también variantes que surgen de mutaciones que se producen de forma natural en la transformación de células bacterianas y vegetales. En la presente invención, una secuencia polinucleotídica proporcionada como la SEQ ID NO: 270 puede usarse para crear variantes que tienen una composición similar, pero no idéntica, a la secuencia polinucleotídica del elemento regulador original, mientras que aún mantiene la funcionalidad general, es decir, un patrón de expresión igual o similar, del elemento regulador original. La producción de dichas variantes de la presente invención está dentro de la experiencia habitual de la técnica a la luz de la divulgación y está incluida dentro del ámbito de la presente invención. Las "variantes" del

elemento regulador quimérico comprenden los mismos elementos constituyentes que una secuencia de referencia, pero los elementos constituyentes que comprenden el elemento regulador quimérico pueden unirse operativamente mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, tales como digestión mediante enzimas de restricción y ligamiento, clonación independiente de ligamiento, ensamblaje modular de productos de la PCR durante la amplificación o síntesis química directa del elemento regulador así como otros procedimientos conocidos en la materia. La "variante" del elemento regulador quimérico resultante puede estar comprendida por los mismos, o variantes de los mismos, elementos constituyentes de la secuencia de referencia pero difieren en la secuencia o secuencias que comprenden la secuencia o secuencias de enlace que permiten que las partes constituyentes se unan operativamente. En la presente invención, una secuencia polinucleotídica proporcionada como la SEQ ID NO: 270 proporciona una secuencia de referencia en la que los elementos constituyentes que comprenden la secuencia de referencia pueden unirse mediante procedimientos conocidos en la técnica y pueden comprender sustituciones, supresiones y/o inserciones de uno o más nucleótidos o mutaciones que se producen de forma natural en la transformación de células bacterianas y vegetales.

Construcciones

Como se usa en el presente documento, el término "construcción" significa cualquier molécula polinucleotídica recombinante tal como un plásmido, cósmido, virus, molécula polinucleotídica que se replica de forma autónoma, fago o molécula polinucleotídica de ADN o ARN monocatenario o bicatenario, lineal o circular, procedente de cualquier fuente, con capacidad de integración genómica o replicación autónoma, que comprende una molécula polinucleotídica en la que una o más moléculas polinucleotídicas se han unido de una manera funcionalmente operativa, es decir, unidas operativamente. Como se usa en el presente documento, el término "vector" significa cualquier construcción polinucleotídica recombinante que se puede usar para el fin de la transformación, es decir, la introducción de ADN heterólogo en una célula huésped.

Como se usa en el presente documento, la expresión "unido operativamente" se refiere a una primera molécula unida a una segunda molécula, en la que las moléculas están dispuestas de manera que la primera molécula altera la función de la segunda molécula. Las dos moléculas pueden ser o no parte de una única molécula contigua y pueden ser o no adyacentes. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible si el promotor modula la transcripción de la molécula polinucleotídica transcribible de interés en una célula.

Las construcciones de la presente invención son en general construcciones de ADN de doble límite de plásmido Ti que tienen las regiones del límite derecho (RB o AGRtu.RB) y del límite izquierdo (LB o AGRtu.LB) del plásmido Ti aisladas de *Agrobacterium tumefaciens* que comprenden un ADN-T, que, junto con moléculas de transferencia proporcionadas por las células de *A. tumefaciens*, permiten la integración del ADN-T en el genoma de una célula vegetal (véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 6.603.061). Las construcciones pueden contener también segmentos de ADN de la cadena principal del plásmido que proporcionan función de replicación y selección antibiótica en células bacterianas, por ejemplo, un origen de replicación de *Escherichia coli* tal como *ori322*, un origen de replicación de amplia variedad de huéspedes, tal como *oriV* u *oriRi*, y una región codificante para un marcador seleccionable tal como *Spec/Strp* que codifica la aminoglucósido adeniltransferasa (*aadA*) de Tn7 que confiere resistencia a la espectinomicina o estreptomicina o un gen marcador seleccionable de gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación de plantas, la cepa bacteriana del huésped es con frecuencia *A. tumefaciens* ABI, C58 o LBA4404; sin embargo, otras cepas conocidas por los expertos en la materia de la transformación de plantas pueden funcionar en la presente invención.

Se conocen en la materia procedimientos para ensamblar e introducir construcciones en una célula de tal manera que la molécula polinucleotídica transcribible se transcriba en una molécula de ARNm funcional que se traduce y expresa como un producto proteico. Para la práctica de la presente invención, las composiciones y procedimientos convencionales para preparar y usar construcciones y células huésped son bien conocidos por los expertos en la materia, véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición volúmenes 1, 2 y 3 (2000) J. F. Sambrook, D. W. Russell y N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Los procedimientos para hacer vectores recombinantes particularmente adecuados para la transformación de plantas incluyen, sin limitación, los descritos en las patentes de los Estados Unidos n.º 4.971.908; 4.940.835; 4.769.061; y 4.757.011 en su totalidad. Estos tipos de vectores también se han revisado en la bibliografía científica (véase, por ejemplo, Rodríguez, y col., Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston, (1988) y Glick, y col., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Ratón, FL. (1993)). Los vectores habituales útiles para la expresión de ácidos nucleicos en plantas superiores son bien conocidos en la técnica e incluyen vectores derivados del plásmido inductor de tumores (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens* (Rogers, y col., Methods in Enzymology 153: 253-277 (1987)). Otros vectores recombinantes útiles para la transformación de plantas, incluyendo el vector de control de transferencia pCaMVN, también se han descrito en la bibliografía científica (véase, por ejemplo, Fromm, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5824-5828 (1985)).

Pueden incluirse diversos elementos reguladores en una construcción. Cualquiera de dichos elementos reguladores puede proporcionarse en combinación con otros elementos reguladores. Dichas combinaciones se pueden diseñar o modificar para producir características reguladoras deseables. Las construcciones de la presente invención comprenderían normalmente al menos un elemento regulador unido operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible unida operativamente a una molécula de terminación de la transcripción 3'.

Las construcciones de la presente invención pueden incluir cualquier promotor o líder conocido en la técnica. Por ejemplo, un promotor de la presente invención puede estar unido operativamente a un líder heterólogo no traducido en 5' tal como uno procedente de un gen de la proteína de choque térmico (véase, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos n.º 5.659.122 y 5.362.865). Como alternativa, un líder de la presente invención se puede unir operativamente a un promotor heterólogo tal como el promotor del transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (véase, la patente de los Estados Unidos n.º 5.352.605).

Como se usa en el presente documento, el término "intrón" se refiere a una molécula de ADN que puede aislarse o identificarse de la copia genómica de un gen y puede definirse en general como una región retirada por corte y empalme durante el procesamiento del ARNm antes de la traducción. Como alternativa, un intrón puede ser un elemento de ADN producido o manipulado sintéticamente. Un intrón puede contener elementos potenciadores de elementos que efectúan la transcripción de genes unidos operativamente. Un intrón puede utilizarse como un elemento regulador para modular la expresión de una molécula polinucleotídica transcribible unida operativamente. Una construcción de ADN puede comprender un intrón, y el intrón puede ser heterólogo o no con respecto a la secuencia de la molécula polinucleotídica transcribible. Los ejemplos de intrones en la técnica incluyen el intrón de actina de arroz (patente de los Estados Unidos n.º 5.641.876) y el intrón de HSP70 de maíz (patente de los Estados Unidos n.º 5.859.347). Los intrones útiles en la práctica de la presente invención incluyen las SEQ ID NO: 172 a 267, las SEQ ID NO: 317 a 323 y las SEQ ID NO: 589 a 778.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de terminación de la transcripción 3'" o "3' UTR" se refiere a una molécula de ADN que se usa durante la transcripción para producir la región no traducida 3' (3' UTR) de una molécula de ARNm. La región no traducida 3' de una molécula de ARNm puede generarse mediante escisión específica y poliadenilación en 3', también conocido como cola de poliA. Una 3' UTR puede estar unida operativamente a y localizada cadena abajo de una molécula polinucleotídica transcribible y puede incluir polinucleótidos que proporcionan una señal de poliadenilación y otras señales reguladoras capaces de alterar la transcripción, el procesamiento del ARNm o la expresión génica. Se piensa que las colas de poliA actúan en la estabilidad del ARNm y en el inicio de la traducción. Son ejemplos de moléculas de terminación de la transcripción 3' en la técnica la región 3' de nopalina sintasa (véase, Fraley, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4803-4807 (1983)); la región 3' de hsp17 del trigo; la región 3' de la subunidad pequeña de la rubisco del guisante; la región 3' de E6 del algodón (patente de los Estados Unidos 6.096.950); las regiones 3' desveladas en el documento WO0011200A2; y la 3' UTR de coixina (patente de los Estados Unidos n.º 6.635.806). Se proporcionan secuencias de las regiones 3' UTR útiles en la práctica de la presente invención como las SEQ ID NO: 270.

Las 3' UTR son un requisito básico para la expresión recombinante de genes específicos. En sistemas animales, se ha definido bien una maquinaria de 3' UTR (p. ej., Zhao y col., Microbiol Mol Biol Rev 63: 405-445 (1999); Proudfoot, Nature 322: 562-565 (1986); Kim y col., Biotechnology Progress 19: 1620-1622 (2003); Yonaha y Proudfoot, EMBO J. 19: 3770-3777 (2000); Cramer y col., FEBS Letters 498: 179-182 (2001); Kuerstem y Goodwin, Nature Reviews Genetics 4: 626-637 (2003)). Se requiere terminación eficaz de la transcripción del ARN para evitar la transcripción no deseada de secuencias no relacionadas con los rasgos (cadena abajo), lo que puede interferir con el desempeño del rasgo (véase más adelante para más detalles). La disposición de múltiples casetes de expresión génica en proximidad local entre sí (p. ej., en un ADN-T) puede causar la supresión de la expresión génica de uno o más genes en dicha construcción en comparación con las inserciones independientes (Padidam y Cao, BioTechniques 31: 328-334 (2001)). Esto puede interferir con la consecución de los niveles adecuados de expresión, por ejemplo, en los casos en los que se desea una fuerte expresión génica de todos los casetes.

En plantas, no se conocen secuencias señal de la poliadenilación claramente definidas. Hasegawa y col., Plant J. 33: 1063-1072, (2003)) no pudieron identificar secuencias señal de poliadenilación conservadas en sistemas *in vitro* e *in vivo* en *Nicotiana glauca* ni de determinar la longitud real del transcrito primario (no poliadenilado). Una 3' UTR débil tiene el potencial de generar una translectura, que puede alterar la expresión de los genes ubicados en los casetes de expresión adyacentes (Padidam y Cao, BioTechniques 31: 328-334 (2001)). El control adecuado de la terminación de la transcripción puede evitar la translectura en secuencias (p. ej., otros casetes de expresión) localizadas cadena abajo y puede permitir además un reciclado eficaz de la ARN polimerasa, para mejorar la expresión génica. Una terminación eficaz de la transcripción (liberación de la ARN polimerasa II procedente del ADN) es un requisito para el reinicio de la transcripción y, de este modo, altera directamente al nivel de transcripción general. Después de la terminación de la transcripción, el ARN maduro se libera desde el sitio de síntesis y el molde al citoplasma. Los ARNm eucariotas se acumulan como formas de poli(A) *in vivo*, de tal manera que es difícil detectar los sitios de terminación de la transcripción mediante procedimientos convencionales. Sin embargo, la predicción de 3' UTR funcionales y eficaces mediante procedimientos bioinformáticos es difícil ya que no existen secuencias conservadas que permitan una predicción fácil de una 3' UTR eficaz.

Desde un punto de vista práctico, se prefiere que una 3' UTR usada en un casete transgénico posea las siguientes características. La 3' UTR debe ser capaz de terminar eficaz y eficientemente la transcripción del transgén y evitar la translectura del transcrito en cualquier secuencia de ADN adyacente que puede estar compuesta por otro casete transgénico como en el caso de múltiples casetes que residen en un ADN-T o el ADN cromosómico adyacente en el que se ha insertado el ADN-T. Las 3' UTR no deberían provocar una reducción de la actividad de la transcripción transmitida por el promotor, el líder y los intrones que se usan para impulsar la expresión del transgén. En biotecnología de plantas, la 3' UTR se usa con frecuencia para el cebado de las reacciones de amplificación del ARN transcrito de forma inversa extraído de la planta transformada y usado para (1) evaluar la actividad de la

transcripción o la expresión del casete transgénico una vez integrado en el cromosoma de la planta; (2) evaluar el número de copias de inserciones en el ADN de la planta; y (3) evaluar la cigosidad de la semilla resultante tras el cultivo. La 3' UTR se usa también en reacciones de amplificación de ADN extraído de la planta transformada para caracterizar la integridad del casete insertado.

Las 3' UTR útiles para proporcionar la expresión de un transgén en plantas se identifican basándose en la expresión de marcadores de secuencia expresados (EST) en bibliotecas de ADNc preparadas a partir de ARN mensajero aislado de semilla, flor y otros tejidos obtenidos de panizo (*Setaria italica* (L.) Beauv). Las bibliotecas de ADNc se elaboran a partir de tejidos aislados de *S. italica* usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia a partir de tejido floral, semilla, hoja y raíz. Los ADNc resultantes se secuencian usando diversos procedimientos de secuenciación conocidos en la técnica. Los EST resultantes se ensamblan en conglomerados usando software bioinformático tal como *clc_ref_assemble_complete* versión 2.01.37139 (CLC bio USA, Cambridge, Massachusetts 02142). Se determinó la abundancia de transcritos de cada conglomerado contando el número de lecturas de ADNc para cada conglomerado. Las 3' UTR identificadas pueden estar compuestas por secuencias procedentes de una secuencia de ADNc así como secuencias procedentes de ADN genómico. La secuencia de ADNc se usa para diseñar cebadores, que se usan a continuación con bibliotecas GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) construidas siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 3' de la secuencia de ADN genómico correspondiente para proporcionar una secuencia de terminación más larga. El análisis de la abundancia relativa del transcrito mediante recuentos directos o recuentos normalizados de lecturas de secuencia observadas para cada biblioteca de tejidos se puede usar para inferir propiedades acerca de patrones de expresión. Por ejemplo, algunas 3' UTR pueden encontrarse en transcritos que se observan en mayor abundancia en el tejido de la raíz a diferencia de la hoja. Esto sugiere que el transcrito está muy expresado en la raíz y que las propiedades de expresión de la raíz pueden ser atribuibles a la regulación de la transcripción del promotor, el líder, los intrones o la 3' UTR. Pruebas empíricas de 3' UTR identificadas por las propiedades de expresión dentro de órganos, tejidos o tipos celulares específicos pueden dar lugar a la identificación de 3' UTR que mejoran la expresión en esos órganos, tejidos o tipos celulares específicos.

Las construcciones y los vectores pueden incluir también una secuencia codificante de un péptido de tránsito que expresa un péptido unido que es útil para dirigirse a un producto proteico, particularmente a un cloroplasto, leucoplasto u otro orgánulo plástico; mitocondria; peroxisoma; vacuola; o una ubicación extracelular. Para descripciones del uso de péptidos de tránsito de cloroplastos, véanse la patente de los Estados Unidos n.º 5.188.642 y la patente de los Estados Unidos n.º 5.728.925. Muchas proteínas localizadas en cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se dirigen al cloroplasto mediante un péptido de tránsito del cloroplasto (CTP, de sus siglas en inglés). Los ejemplos de dichas proteínas de cloroplasto aisladas incluyen, pero sin limitación, las asociadas con la subunidad pequeña (SSU, de sus siglas en inglés) de la ribulosa-1,5,-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, la proteína I y la proteína II del complejo captador de luz, tiorredoxina F, enolpiruvil siquimato fosfato sintasa (EPSPS) y péptidos de tránsito descritos en la patente de los Estados Unidos n.º 7.193.133. Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que las proteínas que no son de cloroplasto pueden dirigirse al cloroplasto mediante el uso de fusiones de proteínas con un CTP heterólogo y que el CTP es suficiente para dirigir una proteína al cloroplasto. Se ha mostrado que la incorporación de un péptido de tránsito de cloroplasto adecuado tal como el CTP de EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (CTP2) (véase, Klee y col., Mol. Genet. 210: 437-442 (1987)) o el CTP de EPSPS de *Petunia hybrida* (CTP4) (véase, della-Cioppa y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6873-6877 (1986)) dirige secuencias de proteínas EPSPS heterólogas a cloroplastos en plantas transgénicas (véase, patentes de los Estados Unidos n.º 5.627.061; 5.633.435; y 5.312.910 y documentos EP 0218571; EP 189707; EP 508909; y EP 924299). Las secuencias que codifican péptidos de tránsito útiles para la presente invención se proporcionan como las SEQ ID NO: 277 a 316. Las secuencias proteicas de péptidos de tránsito útiles para la presente invención se proporcionan como las SEQ ID NO: 324 a 350.

Moléculas polinucleotídicas transcribibles

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula polinucleotídica transcribible" se refiere a cualquier molécula de ADN capaz de transcribirse en una molécula de ARN, incluyendo, pero sin limitación, las que tienen secuencias codificantes de proteínas y las que tienen secuencias útiles para la supresión génica. Un "transgén" se refiere a una molécula polinucleotídica transcribible heteróloga para una célula huésped y/o una molécula polinucleotídica transcribible incorporada artificialmente en el genoma de una célula huésped.

Un promotor puede estar unido operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible que es heteróloga con respecto a la molécula promotora. Como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" se refiere a la combinación de dos o más moléculas polinucleotídicas cuando dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, las dos moléculas pueden obtenerse de diferentes especies y/o las dos moléculas pueden obtenerse de diferentes genes, p. ej., diferentes genes de la misma especie o los mismos genes de diferentes especies. Por tanto, un promotor es heterólogo con respecto a una molécula polinucleotídica transcribible unida operativamente si tal combinación normalmente no se encuentra en la naturaleza, es decir, esa molécula polinucleotídica transcribible no se produce de forma natural unida operativamente en combinación con esa molécula promotora.

La molécula polinucleotídica transcribible puede ser en general cualquier molécula de ADN para la que se desee la expresión de un transcrito de ARN. Dicha expresión de un transcrito puede dar lugar a la traducción de la molécula

de ARNm resultante y, por tanto, la expresión de proteínas. Como alternativa, una molécula polinucleotídica transcribible puede diseñarse para provocar en última instancia una expresión disminuida de un gen o proteína específico. Esto puede lograrse usando una molécula polinucleotídica transcribible que esté orientada en la dirección antisentido. Un experto en la materia está familiarizado con el uso de dicha tecnología antisentido. En resumen, a medida que se transcribe la molécula polinucleotídica transcribible antisentido, el producto de ARN se hibrida y secuestra una molécula de ARN complementaria en el interior de la célula. Esta molécula de ARN bicatenario no se puede traducir en una proteína mediante la maquinaria de traducción de la célula y se degrada en la célula. Cualquier gen puede regularse negativamente de esta manera.

Por tanto, una realización de la invención es un elemento regulador de las SEQ ID NO: 270, unido operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible para modular la transcripción de la molécula polinucleotídica transcribible a un nivel deseado o en un patrón deseado tras la introducción de dicha construcción en una célula vegetal. En una realización, la molécula polinucleotídica transcribible comprende una región codificante de proteína de un gen, y el promotor afecta la transcripción de una molécula de ARN que se traduce y expresa como un producto proteico. En otra realización, la molécula polinucleotídica transcribible comprende una región antisentido de un gen y el promotor altera la transcripción de una molécula de ARN antisentido u otra molécula de ARN inhibidora similar para inhibir la expresión de una molécula de ARN específica de interés en una célula huésped diana.

Genes de interés agronómico

Las moléculas polinucleotídicas transcribibles pueden ser genes de interés agronómico. Como se usa en el presente documento, la expresión "gen de interés agronómico" se refiere a una molécula polinucleotídica transcribible que, cuando se expresa en un tejido vegetal, célula o tipo celular particular, proporciona una característica deseable asociada con la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo, rendimiento, producto, perfil nutricional, resistencia a enfermedades o plagas y/o tolerancia ambiental o química de la planta. Los genes de interés agronómico incluyen, pero sin limitación, los que codifican una proteína de producción, una proteína de resistencia a la tensión, una proteína de control del desarrollo, una proteína de diferenciación tisular, una proteína de meristemo, una proteína ambientalmente sensible, una proteína de senescencia, una proteína sensible a hormonas, una proteína de abscisión, una proteína fuente, una proteína sumidero, una proteína de control de las flores, una proteína de semilla, una proteína de resistencia a herbicidas, una proteína de resistencia a la enfermedad, una enzima biosintética de ácidos grasos, una enzima biosintética de tocoferol, una enzima biosintética de aminoácidos, una proteína pesticida o cualquier otro agente, tal como una molécula antisentido o de iARN que se dirige a un gen particular para la supresión. El producto de un gen de interés agronómico puede actuar en la planta a fin de producir un efecto en la fisiología o metabolismo de la planta o puede actuar como un agente pesticida en la dieta de una plaga que se alimenta de la planta.

En una realización de la invención, se incorpora un promotor en una construcción de tal manera que el promotor esté unido operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible que sea un gen de interés agronómico. La expresión del gen de interés agronómico es deseable a fin de conferir un rasgo agronómicamente beneficioso. Un rasgo agronómicamente beneficioso puede ser, por ejemplo, pero sin limitación, tolerancia a herbicidas, control de insectos, rendimiento modificado, resistencia a enfermedades fúngicas, resistencia a virus, resistencia a nematodos, resistencia a enfermedades bacterianas, crecimiento y desarrollo de la planta, producción de almidón, producción de aceites modificados, producción elevada de aceite, contenido de ácidos grasos modificado, producción elevada de proteínas, maduración del fruto, nutrición animal y humana potenciada, biopolímeros, resistencia a la tensión ambiental, péptidos farmacéuticos y péptidos secretables, rasgos de procesamiento mejorados, digestibilidad mejorada, producción de enzimas, sabor, fijación de nitrógeno, producción de semillas híbridas, producción de fibra y producción de biocombustibles. Los ejemplos de genes de interés agronómico conocidos en la materia incluyen aquellos los de resistencia a herbicidas (patentes de los Estados Unidos n.º 6.803.501; 6.448.476; 6.248.876; 6.225.114; 6.107.549; 5.866.775; 5.804.425; 5.633.435; y 5.463.175), rendimiento aumentado (patentes de los Estados Unidos n.º USRE38.446; 6.716.474; 6.663.906; 6.476.295; 6.441.277; 6.423.828; 6.399.330; 6.372.211; 6.235.971; 6.222.098; y 5.716.837), control de insectos (patentes de los Estados Unidos n.º 6.809.078; 6.713.063; 6.686.452; 6.657.046; 6.645.497; 6.642.030; 6.639.054; 6.620.988; 6.593.293; 6.555.655; 6.538.109; 6.537.756; 6.521.442; 6.501.009; 6.468.523; 6.326.351; 6.313.378; 6.284.949; 6.281.016; 6.248.536; 6.242.241; 6.221.649; 6.177.615; 6.156.573; 6.153.814; 6.110.464; 6.093.695; 6.063.756; 6.063.597; 6.023.013; 5.959.091; 5.942.664; 5.942.658; 5.880.275; 5.763.245; y 5.763.241), resistencia a enfermedades fúngicas (patentes de los Estados Unidos n.º 6.653.280; 6.573.361; 6.506.962; 6.316.407; 6.215.048; 5.516.671; 5.773.696; 6.121.436; 6.316.407; y 6.506.962), resistencia a virus (patentes de los Estados Unidos n.º 6.617.496; 6.608.241; 6.015.940; 6.013.864; 5.850.023; y 5.304.730), resistencia a nematodos (patente de los Estados Unidos n.º 6.228.992), resistencia a enfermedades bacterianas (patente de los Estados Unidos n.º 5.516.671), crecimiento y desarrollo de plantas (patentes de los Estados Unidos n.º 6.723.897 y 6.518.488), producción de almidón (patentes de los Estados Unidos n.º 6.538.181; 6.538.179; 6.538.178; 5.750.876; 6.476.295), producción de aceites modificados (patentes de los Estados Unidos n.º 6.444.876; 6.426.447; y 6.380.462), alta producción de aceite (patentes de los Estados Unidos n.º 6.495.739; 5.608.149; 6.483.008; y 6.476.295), contenido de ácidos grasos modificado (patentes de los Estados Unidos n.º 6.828.475; 6.822.141; 6.770.465; 6.706.950; 6.660.849; 6.596.538; 6.589.767; 6.537.750; 6.489.461; y 6.459.018), alta producción de proteínas (patente de los Estados Unidos n.º 6.380.466), maduración del fruto (patente de los Estados Unidos n.º 5.512.466), nutrición animal y humana potenciada (patentes de los Estados Unidos n.º 6.723.837; 6.653.530; 6.541.259; 5.985.605; y 6.171.640), biopolímeros (patentes de Estados Unidos n.º

USRE37.543; 6.228.623; y 5.958.745, y 6.946.588), resistencia a la tensión ambiental (patente de los Estados Unidos n.º 6.072.103), péptidos farmacéuticos y péptidos secretables (patentes de los Estados Unidos n.º 6.812.379; 6.774.283; 6.140.075; y 6.080.560), rasgos de procesamiento mejorados (patente de los Estados Unidos n.º 6.476.295), digestibilidad mejorada (patente de los Estados Unidos n.º 6.531.648), baja rafinosa (patente de los Estados Unidos n.º 6.166.292), la producción de enzimas industriales (patente de los Estados Unidos n.º 5.543.576), sabor mejorado (patente de los Estados Unidos n.º 6.011.199), fijación de nitrógeno (patente de los Estados Unidos n.º 5.229.114), producción de semillas híbridas (patente de los Estados Unidos n.º 5.689.041), producción de fibra (patentes de los Estados Unidos n.º 6.576.818; 6.271.443; 5.981.834; y 5.869.720) y producción de biocombustible (patente de los Estados Unidos n.º 5.998.700).

Como alternativa, un gen de interés agronómico puede alterar las características o el fenotipo de las plantas anteriormente mencionado codificando una molécula de ARN que produce la modulación dirigida de la expresión génica de un gen endógeno, por ejemplo, a través de antisentido (véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos n.º 5.107.065); ARN inhibidor ("ARNi", incluyendo la modulación de la expresión génica a través de mecanismos mediados por miARN, ARNip, ARNip de acción en *trans* y ARNp en fase, p. ej., como se describe en las solicitudes publicadas US 2006/0200878 y US 2008/0066206 y en la solicitud de patente de los Estados Unidos 11/974.469); o mecanismos mediados por cosupresión. El ARN podría ser también una molécula de ARN catalítico (p. ej., una ribozima o un ribointerruptor; véase, p. ej., el documento US 2006/0200878) obtenida por ingeniería genética para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. Por tanto, cualquier molécula polinucleotídica transcribible que codifica una molécula de ARN transcrito que altera un fenotipo o cambio de morfología agronómicamente importante de interés puede ser útil para la práctica de la presente invención. Se conocen en la técnica procedimientos para construir e introducir construcciones en una célula de tal manera que la molécula polinucleotídica transcribible se transcriba en una molécula que sea capaz de causar supresión génica. Por ejemplo, se desvela supresión génica postranscripcional mediante una construcción con una molécula polinucleotídica transcribible orientada antisentido para regular la expresión génica en células vegetales en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.107.065 y 5.759.829 y se desvela supresión génica postranscripcional mediante una construcción con una molécula polinucleotídica transcribible orientada con sentido para regular la expresión génica en plantas en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.283.184 y 5.231.020. También puede usarse la expresión de un polinucleótido transcribible en una célula vegetal para suprimir plagas de plantas que se alimentan de la célula vegetal, por ejemplo, composiciones aisladas de plagas de coleópteros (publicación de patente de los Estados Unidos n.º US20070124836) y composiciones aisladas de plagas de nematodos (publicación de patente de los Estados Unidos n.º US20070250947). Las plagas de plantas incluyen, pero sin limitación, plagas de artrópodos, plagas de nematodos y plagas fúngicas o microbianas. Las moléculas polinucleotídicas transcribibles ilustrativas para su incorporación en construcciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN o genes de una especie distinta de la especie diana o genes que se originan o están presentes en la misma especie, pero que se incorporan en células receptoras mediante procedimientos de ingeniería genética en lugar de técnicas de reproducción o de mejora clásicas. El tipo de molécula polinucleotídica puede incluir, pero sin limitación, una molécula polinucleotídica que ya está presente en la célula vegetal, una molécula polinucleotídica de otra planta, una molécula polinucleotídica de un organismo diferente o una molécula polinucleotídica generada externamente, tal como una molécula polinucleotídica que contiene un mensaje antisentido de un gen o una molécula polinucleotídica que codifica una versión artificial, sintética o modificada de otro modo de un transgén.

Marcadores seleccionables

Como se usa en el presente documento, el término "marcador" se refiere a cualquier molécula polinucleotídica transcribible cuya expresión, o ausencia de la misma, puede evaluarse o calificarse de alguna manera. Los genes marcadores para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, pero sin limitación, moléculas polinucleotídicas transcribibles que codifican β -glucuronidasa (GUS descrita en la patente de los Estados Unidos n.º 5.599.670), proteína verde fluorescente y variantes de la misma (GFP descrita en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.491.084 y 6.146.826), proteínas que confieren resistencia a antibióticos o proteínas que confieren tolerancia a herbicidas. Se conocen en la técnica marcadores de resistencia a antibióticos útiles, incluyendo los que codifican proteínas que confieren resistencia a kanamicina (*nptII*), higromicina B (*aph IV*), estreptomycin o espectinomycin (*aad*, *spec/strep*) y gentamicina (*aac3* y *aacC4*). Los herbicidas para los que se ha demostrado tolerancia de plantas transgénicas y puede aplicarse el procedimiento de la presente invención, incluyen, pero sin limitación: ácido aminometilfosfónico, glifosato, glufosinato, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinilo, dalapon, dicamba, ciclohexanodiona, inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa y herbicidas de isoxasflutol. Se conocen en la técnica moléculas polinucleotídicas transcribibles que codifican proteínas implicadas en la tolerancia a herbicidas e incluyen, pero sin limitación, una molécula polinucleotídica transcribible que codifica 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS para la tolerancia al glifosato descrita en la patente de los Estados Unidos n.º 5.627.061; 5.633.435; 6.040.497; y 5.094.945); una molécula polinucleotídica transcribible que codifica una glifosato oxidoreductasa y una glifosato-N-acetil transferasa (GOX descrita en la patente de los Estados Unidos n.º 5.463.175; GAT descrita en la publicación de patente de los Estados Unidos n.º 20030083480 y dicamba monooxigenasa, en la publicación de patente de los Estados Unidos n.º 20030135879); una molécula polinucleotídica transcribible que codifica bromoxinilo nitrilasa (*Bxn* para tolerancia a bromoxinilo descrita en la patente de los Estados Unidos n.º 4.810.648); una molécula polinucleotídica transcribible que codifica la fitoeno desaturasa (*crtI*) descrita en Misawa, y col., Plant Journal 4: 833-840 (1993) y Misawa, y col., Plant Journal 6: 481-489 (1994) para la tolerancia a norflurazona; una molécula polinucleotídica transcribible que codifica la acetohidroxiácido sintasa (AHAS, también conocida como ALS)

descrita en Sathasiivan, y col., Nucl. Acids Res. 18: 2188-2193 (1990) para la tolerancia a los herbicidas de sulfonilurea; y el gen *bar* descrito en DeBlock, y col., EMBO Journal 6: 2513-2519 (1987) para la tolerancia al glufosinato y bialafos. Las moléculas promotoras de la presente invención pueden expresar moléculas polinucleotídicas transcribibles unidas que codifican fosfinotricina acetiltransferasa, EPSPS resistente a glifosato, aminoglucósido fosfotransferasa, hidroxifenil piruvato deshidrogenasa, higromicina fosfotransferasa, neomicina fosfotransferasa, dalapon deshalogenasa, nitrilasa resistente a bromoxinilo, antranilato sintasa, ariloxialcanoato dioxigenasas, acetil CoA carboxilasa, glifosato oxidorreductasa y glifosato-N-acetil transferasa.

También se incluyen en la expresión "marcadores seleccionables" genes que codifican un marcador secretable cuya secreción puede detectarse como un medio para identificar o seleccionar células transformadas. Los ejemplos incluyen marcadores que codifican un antígeno secretable que se puede identificar por la interacción de anticuerpos o incluso enzimas secretables que pueden detectarse catalíticamente. Las proteínas marcadoras secretadas seleccionables se encuentran en varias clases, incluyendo proteínas pequeñas, difundibles, que son detectables, (p. ej., mediante ELISA), enzimas pequeñas activas que son detectables en solución extracelular (p. ej., alfa-amilasa, beta-lactamasa, fosfinotricina transferasa) o proteínas que se insertan o inmovilizan en la pared celular (tales como proteínas que incluyen una secuencia líder, tal como la que se encuentra en la unidad de expresión de extensión o proteínas relacionadas con la patogenia del tabaco, también conocidas como PR-S de tabaco). Otros posibles genes marcadores seleccionables resultarán evidentes para los expertos en la materia y están incluidos en la presente invención.

Transformación celular

La invención también está dirigida a un procedimiento para producir células y plantas transformadas que comprenden un promotor unido operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible.

El término "transformación" se refiere a la introducción de ácido nucleico en un huésped receptor. Como se usa en el presente documento, el término "huésped" se refiere a bacterias, hongos o plantas, incluyendo cualquier célula, tejido, órgano o descendencia de las bacterias, hongos o plantas. Los tejidos y células vegetales de particular interés incluyen protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, plántulas, embriones y polen.

Como se usa en el presente documento, el término "transformado" se refiere a una célula, tejido, órgano u organismo en el que se ha introducido una molécula polinucleotídica extraña, tal como una construcción. La molécula polinucleotídica introducida puede integrarse en el ADN genómico de la célula, tejido, órgano u organismo receptores de modo que la descendencia posterior herede la molécula polinucleotídica introducida. Un célula u organismo "transgénico" o "transformado" incluye también la descendencia de la célula u organismo y descendencia producida a partir de un programa de cultivo que emplea dicho organismo transgénico como un precursor en un cruce y que presenta un fenotipo alterado resultante de la presencia de una molécula polinucleotídica extraña. El término "transgénico" se refiere a una bacteria, hongo o planta que contienen una o más moléculas de ácido polinucleico heterólogas.

Existen muchos procedimientos para introducir moléculas de ácido polinucleico en células vegetales. El procedimiento comprende en general las etapas de seleccionar una célula huésped adecuada, transformar la célula huésped con un vector recombinante y obtener la célula huésped transformada. Los procedimientos adecuados incluyen la infección bacteriana (p. ej., *Agrobacterium*), vectores binarios de cromosomas artificiales bacterianos, suministro directo de ADN (p. ej., mediante transformación mediada por PEG, captación de ADN mediada por desecación/inhibición, electroporación, agitación con fibras de carburo de silicio y aceleración de partículas recubiertas de ADN, etc. (revisado en Potrykus, y col., Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 205 (1991))).

La tecnología para la introducción de una molécula de ADN en células es bien conocida por los expertos en la materia. Los procedimientos y materiales para transformar células vegetales mediante la introducción de una construcción de ADN vegetal en un genoma de planta en la práctica de la presente invención pueden incluir cualquiera de los procedimientos bien conocidos y demostrados, incluyendo, pero sin limitación:

(1) procedimientos químicos (Graham y Van der Eb, Virology 54: 536-539 (1973) y Zatloukal, y col., Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 136-153 (1992));

(2) procedimientos físicos tales como la microinyección (Capecchi, Cell 22: 479-488 (1980)), electroporación (Wong y Neumann, Biochim. Biophys. Res. Commun., 107: 584-587 (1982); Fromm, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5824-5828 (1985); patente de los Estados Unidos n.º 5.384.253), aceleración de partículas (Johnston y Tang, Methods Cell Biol. 43(A): 353-365 (1994); Fynan, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11478-11482 (1993)); y bombardeo con microproyectiles (como se ilustra en la patente de los Estados Unidos n.º 5.015.580; 5.550.318; 5.538.880; 6.160.208; 6.399.861; y 6.403.865);

(3) vectores víricos (Clapp, Clin. Perinatol. 20: 155-168 (1993); Lu, y col., J. Exp. Med. 178: 2089-2096 (1993); Eglitis y Anderson, Biotechniques 6: 608-614 (1988));

(4) mecanismos mediados por receptores (Curiel y col., Hum. Gen. Ther. 3: 147-154 (1992) y Wagner, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6099-6103 (1992); (5) mecanismos mediados por bacterias tales como transformación mediada por *Agrobacterium* (como se ilustra en la patente de los Estados Unidos n.º 5.824.877; 5.591.616; 5.981.840; y 6.384.301); introducción directa en el polen inyectando en los órganos reproductores de una planta (Zhou, y col., Methods in Enzymology 101: 433, (1983); Hess, Intern Rev. Cytol. 107: 367 (1987); Luo,

y col., Plant Mol Biol. Reporter 6: 165 (1988); Pena, y col., Nature 325: 274 (1987));
 (7) transformación de protoplastos (como se ilustra en la patente de los Estados Unidos n.º 5.508.184); y
 (8) inyección en embriones inmaduros (Neuhaus, y col., Theor. Appl. Genet. 75: 30 (1987)).

Cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente se puede utilizar para transformar una célula huésped con uno o más promotores y/o construcciones de la presente. Las células huésped pueden ser cualquier célula u organismo, tal como una célula vegetal, célula de alga, alga, célula fúngica, hongo, célula bacteriana o célula de insecto. Los huéspedes y células transformadas preferidos incluyen células de: plantas, *Aspergillus*, levaduras, insectos, bacterias y algas.

Se han publicado procedimientos para transformar plantas dicotiledóneas, principalmente mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y obtener plantas transgénicas para algodón (patente de los Estados Unidos n.º 5.004.863; 5.159.135; y 5.518.908); soja (patentes de los Estados Unidos n.º 5.569.834 y 5.416.011; véase también, McCabe, y col., Biotechnology 6: 923 (1988) y Christou y col., Plant Physiol. 87: 671-674 (1988)); *Brassica* (patente de los Estados Unidos n.º 5.463.174); cacahuete (Cheng y col., Plant Cell Rep. 15: 653-657 (1996) y McKently y col., Plant Cell Rep. 14: 699-703 (1995)); papaya; y guisante (Grant y col., Plant Cell Rep. 15: 254-258 (1995)).

También se ha informado de transformaciones de plantas monocotiledóneas usando electroporación, bombardeo de partículas y *Agrobacterium*. Se ha logrado la transformación y regeneración vegetal en el espárrago (Bytebier, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84: 5354 (1987); cebada (Wan y Lemaux, Plant Physiol. 104: 37 (1994)); maíz (Rhodes, y col., Science 240: 204 (1988), Gordon-Kamm, y col., Plant Cell 2: 603-618 (1990), Fromm, y col., Bio/Technology, 8: 833 (1990), Koziel y col., Bio/Technology 11: 194 (1993) y Armstrong, y col., Crop Science 35: 550-557 (1995)); avena (Somers, y col., Bio/Technology 10: 1589 (1992)); pasto ovillo (Horn, y col., Plant Cell Rep. 7: 469 (1988)); centeno (De la Pena, y col., Nature, 325: 274 (1987)); caña de azúcar (Bower y Birch, Plant Journal 2: 409 (1992)); festuca cañosa (Wang, y col., Bio/Technology 10: 691 (1992)); y trigo (Vasil, y col., Bio/Technology 10: 667 (1992) y patente de los Estados Unidos n.º 5.631.152).

La regeneración, el desarrollo y el cultivo de plantas a partir de explantes o protoplasto vegetal transformado es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, (Eds.), Academic Press, Inc., San Diego, CA (1988) y Horsch y col., Science 227: 1229-1231 (1985)). Las células transformadas generalmente se cultivan en presencia de un medio selectivo, que selecciona las células transformadas con éxito e induce la regeneración de brotes y raíces de plantas en plantas intactas (Fraley, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 4803 (1983)). Las plantas transformadas se obtienen normalmente en un periodo de dos a cuatro meses.

Las plantas transgénicas regeneradas se autopolinizan para proporcionar plantas transgénicas homocigóticas. Como alternativa, el polen obtenido de las plantas transgénicas regeneradas puede cruzarse con plantas no transgénicas, preferentemente líneas endógamas de especies agrónomicamente importantes. Pueden encontrarse descripciones de los procedimientos reproductivos que se usan habitualmente para los diferentes rasgos y cultivos 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); Snee y Hendriksen, Plant breeding perspectives, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, Soybeans: Improvement, Production and Uses, 2ª 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). Por el contrario, se puede usar polen de plantas no transgénicas para polinizar las plantas transgénicas regeneradas.

Las plantas transformadas pueden analizarse para determinar la presencia de los genes de interés y el nivel de expresión y/o perfil conferido por los elementos reguladores de la presente invención. Los expertos en la materia conocen los numerosos procedimientos disponibles para el análisis de las plantas transformadas. Por ejemplo, los procedimientos para el análisis de plantas incluyen, pero sin limitación, transferencias de Southern o transferencias de Northern, enfoques basados en PCR, análisis bioquímicos, procedimientos de cribado fenotípico, evaluaciones de campo y ensayos inmunodiagnósticos. La expresión de una molécula polinucleotídica transcribible se puede medir usando reactivos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) y procedimientos descritos por el fabricante y tiempos de ciclo de PCR determinados utilizando la matriz de prueba TaqMan®. Como alternativa, los reactivos Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) y procedimientos descritos por el fabricante se pueden usar para expresión transgénica.

Se pueden cosechar las semillas de las plantas de la presente invención a partir de plantas transgénicas fértiles y usarse para cultivar generaciones descendientes de plantas transformadas de la presente invención incluyendo líneas de plantas híbridas que comprenden la construcción de la presente invención y que expresan un gen de interés agronómico.

La presente invención también proporciona partes de las plantas de la presente invención. Las partes de plantas, sin limitación, incluyen hojas, tallos, raíces, tubérculos, semillas, endospermo, óvulos y polen. La invención también incluye y proporciona células vegetales transformadas que comprenden una molécula de ácido nucleico de la presente invención.

La planta transgénica puede transmitir la molécula polinucleotídica transgénica a su descendencia. La descendencia incluye cualquier parte de planta o semilla regenerable que comprenda el transgén procedente de una planta antecesora. La planta transgénica es preferentemente homocigótica para la molécula polinucleotídica transformada y transmite esa secuencia a todos los descendientes como resultado de la reproducción sexual. La descendencia puede crecer a partir de semillas producidas por la planta transgénica. Estas plantas adicionales pueden a continuación autopolinizarse para generar una verdadera línea de cultivo de plantas. Se evaluó la descendencia de estas plantas, entre otras cosas, con respecto a la expresión génica. Se puede detectar la expresión génica mediante varios procedimientos habituales tales como la transferencia de Western, transferencia de Northern, inmunoprecipitación y ELISA.

Habiendo ahora descrito de forma general la invención, esta se entenderá más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que limiten la presente invención, a menos que se especifique. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas desveladas en los siguientes ejemplos representan técnicas que los inventores han descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención. Sin embargo, los expertos en la materia deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y aun así obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y ámbito de la invención, por lo tanto, toda la materia expuesta o mostrada en los dibujos adjuntos debe interpretarse como ilustrativa y no en un sentido limitativo.

Ejemplos

Se aislaron elementos reguladores útiles para impulsar la expresión de un polinucleótido transcribible unido operativamente en plantas transgénicas y se analizó el patrón de expresión de estos elementos reguladores unidos operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible en plantas de soja transgénica.

Ejemplo 1: Identificación y clonación de nuevos elementos reguladores: promotores, líderes e intrones.

Se identificaron y aislaron elementos reguladores del ADN genómico de las especies monocotiledóneas, panizo (*Setaria italica* (L.) Beauv). Se usaron secuencias genómicas y EST patentadas y genómicas y EST públicas para diseñar cebadores, que se usaron a continuación con bibliotecas GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) construidas siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 5' de la secuencia de ADN genómico correspondiente. En el caso de promotores, líderes e intrones, esta región clonada comprendía el regulador transcripcional 5', 5' UTR y, si está presente, secuencia intrónica cadena arriba de la región codificante de proteínas para cada gen de *S. italica*. Usando esta secuencia, se identificaron elementos reguladores por bioinformática dentro de la región 5' para cada gen. Se usó análisis bioinformático para identificar el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y cualquier bidireccionalidad, intrones o secuencia codificante cadena arriba presente en la secuencia. Usando los resultados de este análisis, se definieron elementos reguladores dentro de la secuencia 5' cadena arriba de la secuencia codificante del gen. A continuación, se diseñaron cebadores para amplificar los elementos reguladores. Se amplificó la molécula de ADN correspondiente para cada elemento regulador usando condiciones convencionales de reacción en cadena de la polimerasa con cebadores que contienen sitios de enzimas de restricción únicos y ADN genómico aislado de *S. italica*. Los fragmentos de ADN resultantes se ligaron en un vector de expresión de plantas básico usando digestión con enzimas de restricción convencional de sitios de restricción compatibles y procedimientos de ligamiento de ADN.

Se enumeran secuencias de elementos reguladores, elementos codificantes de péptidos de tránsito y secuencias de proteínas de péptidos de tránsito identificadas a partir de *S. italica* en la tabla 1 a continuación. Se proporcionan en el presente documento secuencias de los elementos reguladores identificados a partir de *S. italica* como las SEQ ID NO: 1 a 276, las SEQ ID NO: 317 a 323 y 352 a 924. Se proporcionan en el presente documento grupos de elementos reguladores transcripcionales (EXP) compuestos por un promotor, líder e intrón unidos operativamente o un promotor, líder, intrón y líder unidos operativamente como las SEQ ID NO: 1 a 22. Se proporcionan en el presente documento secuencias promotoras como las SEQ ID NO: 23 a 105 y las SEQ ID NO: 353 a 536. Se proporcionan en el presente documento secuencias líder como las SEQ ID NO: 106 a 171 y las SEQ ID NO: 537 a 588. Se proporcionan secuencias intrónicas como las SEQ ID NO: 172 a 267, las SEQ ID NO: 317 a 323 y las SEQ ID NO: 589 a 778. Se proporcionan en el presente documento secuencias que comprenden 3' UTR como las SEQ ID NO: 268 a 276 y las SEQ ID NO: 779 a 924. Se proporcionan en el presente documento secuencias que codifican los péptidos de tránsito como las SEQ ID NO: 277 a 316. El ADN genómico que codifica algunos de los péptidos de tránsito también está compuesto por intrones presentados como los SEQ ID NO: 317 a 323. Se proporcionan en el presente documento secuencias proteicas de péptidos de tránsito como las SEQ ID NO: 324 a 350. Se proporciona un elemento potenciador como la SEQ ID NO: 352.

Tabla 1. Elementos reguladores y promotores, líderes e intrones correspondientes; y secuencias de tránsito (localización).

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
EXP-FMV.3 5 S-SETit. Ccoamt	1	Cafeoil CoA metiltransferasa mejorada

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
EXP-FMV.3 5 S-SETit. Gst: a	2	Glutación S-transferasa mejorada
EXP-FMV. 35S-SETit.Gst: b	3	Glutación S-transferasa mejorada
EXP-FMV.35S-SETit.lfr	4	Isoflavona reductasa mejorada
EXP-FMV.35S-SETit.Pox	5	Peroxidasa mejorada
EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:a	6	Proteína de transferencia de lípidos mejorada-RCc3
EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:b	7	Proteína de transferencia de lípidos mejorada-RCc3
EXP-FMV.35S-SETit.Tip	8	Proteína intrínseca de tonoplasto mejorada
EXP-SETit.Act8:1:1	9	Actina 8
EXP-SETit.Act8:1:2	10	Actina 8
EXP-SETit.Act8:c	11	Actina 8-1
EXP-SETit.CLUS120796-1	12	Conglomerado 120796-1
EXP-SETit.CLUS19108	13	Conglomerado 19108
EXP-SETit.Ppdk: 1:1	14	Piruvato ortofosfato dicinasa
EXP-SETit.TubA2:1:1	15	Tubulina A2
EXP-SETit.TubA2:1:3	16	Tubulina A2
EXP-SETit.TubA2-1:1:2	17	Tubulina A2-1
EXP-SETit.TubA2-2:1:1	18	Tubulina A2-2
EXP-SETit.TubA3:1:3	19	Tubulina A3
EXP-SETit.Ubq 1:1:1	20	Ubiquitina 1
EXP-SETit.Ubq 1:1:3	21	Ubiquitina 1
EXP-SETit.Ubq5	22	Ubiquitina 5
P-SETit.25509-1:1:3	23	Conglomerado 25509
P-SETit.Act8-1:1:5	24	Actina 8
P-SETit.Act8-1:1:6	25	Actina 8
P-SETit.Act8-1-1:1:2	26	Actina 8-1
P-SETit.Aip-1:1:1	27	Proteína inducida por auxina
P-SETit.Alc1-1:1:1	28	Alfa-coixina
P-SETit.Alc1-1:1:2	29	Alfa-coixina
P-SETit.Alc2-1:1:2	30	Alfa-coixina
P-SETit.Ali 1-1:1:3	31	Proteína inducida por aluminio
P-SETit.Cab 1-1:1:1	32	Proteína de unión a clorofila a/b-1
P-SETit.Cab3-1:1:3	33	Proteína de unión a clorofila a/b-3
P-SETit.Cbl7-1:1:1	34	Proteína de tipo calcineurina B
P-SETit. Ccoamt-1:1:2	35	Cafeoil CoA metiltransferasa
P-SETit.Cda-1:1:1	36	Proteína asociada a la muerte celular
P-SETit.CLUS1164825-1-1:1:1	37	Conglomerado 1164825-1
P-SETit.CLUS1165324-1:1:1	38	Conglomerado 1165324-1
P-SETit.CLUS120796-1-1:1:1	39	Conglomerado 120796-1
P-SETit.CLUS19108-1:1:2	40	Conglomerado 19108
P-SETit.CLUS882664-1-1:1:2	41	Conglomerado 882664-1
P-SETit.CP29-1:1:4	42	Proteína de cloroplasto-29
P-SETit.Cyp-1-1:1:1	43	Cisteína proteasa-1
P-SETit.Cyp78a-1:1:2	44	Cisteína proteasa-78a
P-SETit.Cys-1:1:2	45	Cisteína sintasa
P-SETit.Cys-1:1:3	46	Cisteína sintasa
P-SETit.Dzs-1:1:4	47	Proteína de almacenamiento de zeína delta
P-SETit.Dzs-1:1:5	48	Proteína de almacenamiento de zeína delta
P-SETit.Eie-1:1:1	49	Factor de elongación
P-SETit.EST CLUS675389-2-1:1:2	50	Conglomerado 675389-2
P-SETit.Fba-1:1:1	51	Fructosa-bisfosfato aldolasa
P-SETit.FM54-1:1:2	52	Conglomerado 1102871 1
P-SETit.FM63-1:1:2	53	Conglomerado 1019870 1
P-SETit.Fst-1:1:1	54	Flavonol 4-sulfotransferasa
P-SETit.Gapdh2-1:1:3	55	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
P-SETit.Grcw2-1:1:1	56	Proteína estructural 2 de la pared celular rica en glicina
P-SETit.Grf-1:1:2	57	Posible factor regulador del crecimiento
P-SETit.Gst-1:1:1	58	Glutación S-transferasa
P-SETit.Gst-1:1:2	59	Glutación S-transferasa
P-SETit.lfr-1:1:2	60	Isoflavona reductasa
P-SETit.lfr-1:1:3	61	Isoflavona reductasa
P-SETit.LaDo-1:1:2	62	Leucoantocianidina dioxigenasa
P-SETit.Mt1-1:1:2	63	Proteína 1 de tipo metalotioneína

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
P-SETit.Nrt2-1:1:2	64	Proteína de tipo transportador de nitrato
P-SETit.Nrt2-1:1:3	65	Proteína de tipo transportador de nitrato
P-SETit.OMT2.1-1:1:2	66	O-metiltransferasa-2.1
P-SETit.OMT2.2-1:1:2	67	O-metiltransferasa-2.2
P-SETit.OMT2.3-1:1:1	68	O-metiltransferasa-2.3
P-SETit.Omt3-1:1:3	69	O-metiltransferasa-3
P-SETit.Omt4 2-1:1:2	70	O-metiltransferasa-4.2
P-SETit.Pip2-1:1:3	71	Acuaporina
P-SETit.Pip2-3-1:1:1	72	Acuaporina
P-SETit.Pox-1:1:1	73	Peroxidasa 1
P-SETit.Ppc-1:1:3	74	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P-SETit.Ppc-1:1:4	75	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P-SETit.Ppdk-1:1:1	76	Piruvato ortofosfato dicinasa
P-SETit.Pro1-1:1:2	77	Prolamina
P-SETit.Pro2-1:1:3	78	Prolamina
P-SETit.Prx-1:1:1	79	Peroxidasa
P-SETit.Prx17-1:1:2	80	Peroxidasa-17
P-SETit.Prx2-1:1:3	81	Peroxidasa-2
P-SETit.Prx3-1:1:3	82	Peroxidasa-3
P-SETit.Prx3-1:1:4	83	Peroxidasa-3
P-SETit.Prx47-1:1:2	84	Peroxidasa-47
P-SETit.Prx72-1:1:2	85	Peroxidasa-72
P-SETit.PSI-4a-1:1:1	86	Fotosistema 1 4a
P-SETit.Rbcs-1:1:1	87	Subunidad pequeña de la RUBISCO
P-SETit.Rcc3-1:1:1	88	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:10	89	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:11	90	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:16	91	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit. Srp-1:1:2	92	Proteína sensible a la tensión
P-SETit.Ssp1-1:1:1	93	Proteína de almacenamiento de semillas
P-SETit.Ssp1-1:1:2	94	Proteína de almacenamiento de semillas
P-SETit.Tga6-1:1:2	95	Arquitectura de la gluma de teosinte
P-SETit.Tip-1:1:1	96	Proteína intrínseca de tonoplasto
P-SETit.Tip-1:1:4	97	Proteína intrínseca de tonoplasto
P-SETit.TubA2-1-1:1:2	98	Tubulina A2-1
P-SETit.TubA2-1-1:1:3	99	Tubulina A2-1
P-SETit.TubA2-2-1:1:3	100	Tubulina A2-2
P-SETit.TubA3-1:1:3	101	Tubulina A3
P-SETit.Ubq 1-1:1:1	102	Ubiquitina 1
P-SETit.Ubq 1-1:1:3	103	Ubiquitina 1
P-SETit.Ubq5-1:1:2	104	Ubiquitina 5
P-SETit.Ucc1-1:1:2	105	Uclacianina
L-SETit.Act8-1:1:2	106	Actina 8
L-SETit.Act8-1:1:3	107	Actina 8
L-SETit.Act8-1:1:4	108	Actina 8-1
L-SETit. Aip-1:1:1	109	Proteína inducida por auxina
L-SETit.Alc1-1:1:1	110	Alfa-coixina
L-SETit.Alc2-1:1:1	111	Alfa-coixina
L-SETit.Ali1-1:1:1	112	Proteína inducida por aluminio
L-SETit.Cab 1-1:1:1	113	Proteína de unión a clorofila a/b-1
L-SETit.Cab3-1:1:1	114	Proteína de unión a clorofila a/b-3
L-SETit.Cbl7-1:1:1	115	Proteína de tipo calcineurina B
L-SETit.Ccoamt-1:1:2	116	Cafeoil CoA metiltransferasa
L-SETit.Cda-1:1:1	117	Proteína asociada a la muerte celular
L-SETit.CLUS1164825-1-1:1:1	118	Conglomerado 1164825-1
L-SETit.CLUS120796-1-1:1:1	119	Conglomerado 120796-1
L-SETit.CLUS120796-1-1:1:2	120	Conglomerado 120796-1
L-SETit.CLUS19108-1:1:1	121	Conglomerado 19108
L-SETit.CLUS19108-1:1:2	122	Conglomerado 19108
L-SETit.CLUS882664-1-1:1:1	123	Conglomerado 882664-1
L-SETit.CP29-1:1:1	124	Proteína de cloroplasto-29
L-SETit.Cyp-1-1:1:1	125	Cisteína proteasa-1

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
L-SETit.Cyp78a-1:1:1	126	Cisteína proteasa-78a
L-SETit.Cys-1:1:1	127	Cisteína sintasa
L-SETit.Dzs-1:1:1	128	Proteína de almacenamiento de zeína delta
L-SETit.Eie-1:1:1	129	Factor de elongación
L-SETit. EST CLUS675389-2-1:1:1	130	Conglomerado 675389-2
L-SETit.Fba-1:1:1	131	Fructosa-bisfosfato aldolasa
L-SETit.Fst-1:1:1	132	Flavonol 4-sulfotransferasa
L-SETit.Gapdh2-1:1:1	133	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
L-SETit.Grcw2-1:1:1	134	Proteína estructural 2 de la pared celular rica en glicina
L-SETit.Gst-1:1:1	135	Glutación S-transferasa
L-SETit.Ifr-1:1:1	136	Isoflavona reductasa
L-SETit.LaDo-1:1:1	137	Leucoantocianidina dioxigenasa
L-SETit.Mt1-1:1:1	138	Proteína 1 de tipo metalotioneína
L-SETit.Nrt2-1:1:2	139	Proteína de tipo transportador de nitrato
L-SETit.OMT2.1-1:1:1	140	O-metiltransferasa-2.1
L-SETit.OMT2.2-1:1:1	141	O-metiltransferasa-2.2
L-SETit.OMT2.2-1:1:2	142	O-metiltransferasa-2.3
L-SETit.Omt3-1:1:1	143	O-metiltransferasa-3
L-SETit.Omt4 2-1:1:1	144	O-metiltransferasa-4.2
L-SETit.Pip2-1:1:1	145	Acuaporina
L-SETit.Pip2-3-1:1:1	146	Acuaporina
L-SETit.Pox-1:1:1	147	Peroxidasa 1
L-SETit.Ppc-1:1:1	148	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
L-SETit.Ppdk-1:1:2	149	Piruvato ortofosfato dicinasa
L-SETit.Ppdk-1:1:4	150	Piruvato ortofosfato dicinasa
L-SETit.Pro1-1:1:1	151	Prolamina
L-SETit.Pro2-1:1:2	152	Prolamina
L-SETit.Prx-1:1:1	153	Peroxidasa
L-SETit.Prx17-1:1:1	154	Peroxidasa-17
L-SETit.Prx2-1:1:2	155	Peroxidasa-2
L-SETit.Prx3-1:1:1	156	Peroxidasa-3
L-SETit.Prx47-1:1:1	157	Peroxidasa-47
L-SETit.Prx72-1:1:1	158	Peroxidasa-72
L-SETit.PSI-4a-1:1:1	159	Fotosistema 1 4a
L-SETit.Rbcs-1:1:1	160	Subunidad pequeña de la RUBISCO
L-SETit.Rcc3-1:1:1	161	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
L-SETit.Rcc3-1:1:2	162	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
L-SETit.Srp-1:1:1	163	Proteína sensible a la tensión
L-SETit.Ssp1-1:1:1	164	Proteína de almacenamiento de semillas
L-SETit.Tip-1:1:1	165	Proteína intrínseca de tonoplasto
L-SETit.TubA2-1-1:1:1	166	Tubulina A2-1
L-SETit.TubA2-2-1:1:1	167	Tubulina A2-2
L-SETit.TubA3-1:1:1	168	Tubulina A3
L-SETit.Ubq 1-1:1:1	169	Ubiquitina 1
L-SETit.Ubq5-1:1:1	170	Ubiquitina 5
L-SETit.Ucc1-1:1:1	171	Uclacianina
I-SETit.Act8-1:1:2	172	Actina 8
I-SETit.CLUS120796-1-1:1:1	173	Conglomerado 120796-1
I-SETit.CLUS19108-1:1:1	174	Conglomerado 19108
I-SETit.Ppdk-1:1:1	175	Piruvato ortofosfato dicinasa
I-SETit.TubA2 1-1:1:2	176	Tubulina A2-1
I-SETit.Ubq 1-1:1:1	177	Ubiquitina 1
I-SETit.Ubq5-1:1:2	178	Ubiquitina 5
I-SETit.14-3-3A-2-1:1:1	179	Proteína A de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2	180	Proteína A de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3A-4-1:1:2	181	Proteína A de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3A-5-1:1:2	182	Proteína A de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3B-2-1:1:1	183	Proteína B de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3B-3-1:1:2	184	Proteína B de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3B-4-1:1:2	185	Proteína B de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3B-5-1:1:2	186	Proteína B de tipo 14-3-3
I-SETit. 14-3-3C-1-1:1:1	187	Proteína C de tipo 14-3-3

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
I-SETit.14-3-3C-2-1:1:1	188	Proteína C de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2	189	Proteína C de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3C-4-1:1:2	190	Proteína C de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3C-5-1:1:2	191	Proteína C de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3D-1-1:1:2	192	Proteína D de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3D-2-1:1:1	193	Proteína D de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3D-3-1:1:2	194	Proteína D de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3D-4-1:1:3	195	Proteína D de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3D-5-1:1:2	196	Proteína D de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3E-2-1:1:1	197	Proteína E de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3E-3-1:1:2	198	Proteína E de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3E-4-1:1:2	199	Proteína E de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3E-5-1:1:2	200	Proteína E de tipo 14-3-3
I-SETit.40S-7S-1_1-1:1:2	201	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-1_2-1:1:2	202	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-1_3-1:1:2	203	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-1_4-1:1:2	204	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-2_2-1:1:1	205	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-2_3-1:1:1	206	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-2_4-1:1:1	207	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-3_1-1:1:2	208	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-3_2-1:1:2	209	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-3_3-1:1:2	210	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.60S_L10A1-1-1:1:2	211	Proteína ribosómica de 60S L10A1
I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:2	212	Proteína ribosómica de 60S L10A1
I-SETit.60S_L10A1-3-1:1:2	213	Proteína ribosómica de 60S L10A1
I-SETit.60S_L10A1-4-1:1:1	214	Proteína ribosómica de 60S L10A1
I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:2	215	Proteína ribosómica de 60S L10A1
I-SETit.ASA2-3-1:1:2	216	Subunidad alfa 2 de antranilato sintasa
I-SETit.ClpD-1-1:1:1	217	Subunidad de unión a ATP de proteasa Clp dependiente de ATP
I-SETit.DnaJ_1-1:1:2	218	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2	219	Proteína de choque térmico
I-SETit.eEF1g_1-1:1:2	220	Factor de elongación 1 gamma
I-SETit.eEF1g_4-1:1:3	221	Factor de elongación 1 gamma
I-SETit.eIF5A1-1-1:1:1	222	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-2-1:1:2	223	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2	224	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2	225	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-5-1:1:2	226	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-1-1:1:2	227	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-2-1:1:3	228	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-3-1:1:2	229	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-4-1:1:2	230	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2	231	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-1-1:1:1	232	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2	233	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2	234	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2	235	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-5-1:1:2	236	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.GAD_1-1:1:2	237	UDP-ácido glucurónico descarboxilasa
I-SETit.GAD_2-1:1:2	238	UDP-ácido glucurónico descarboxilasa
I-SETit.GAD_3-1:1:2	239	UDP-ácido glucurónico descarboxilasa
I-SETit.GAD_4-1:1:2	240	UDP-ácido glucurónico descarboxilasa
I-SETit.Grf1-3-1:1:1	241	Posible factor regulador del crecimiento
I-SETit.GRP-1-1:1:1	242	Proteína de unión a ARN rica en glicina
I-SETit.LSm8-1-1:1:2	243	Proteína de tipo Sm asociada a ARNnp U6 LSM8
I-SETit.LSm8-2-1:1:1	244	Proteína de tipo Sm asociada a ARNnp U6 LSM8
I-SETit.LSm8-3-1:1:1	245	Proteína de tipo Sm asociada a ARNnp U6 LSM8
I-SETit.LSm8-4-1:1:2	246	Proteína de tipo Sm asociada a ARNnp U6 LSM8
I-SETit.PGK3_1-1:1:2	247	Fosfoglicerato cinasa
I-SETit.PGK3_2-1:1:1	248	Fosfoglicerato cinasa

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
I-SETit.PIP1 1 2-1:1:1	249	Aguaporina
I-SETit.PIP1-1 1-1:1:1	250	Aguaporina
I-SETit.PIP1-1 3-1:1:2	251	Aguaporina
I-SETit.PIP1-4 3-1:1:2	252	Aguaporina
I-SETit.PIP2-2 2-1:1:2	253	Aguaporina
I-SETit.PIP2-2 3-1:1:2	254	Aguaporina
I-SETit.PIP2-5 2-1:1:2	255	Aguaporina
I-SETit.PIP2-5 3-1:1:2	256	Aguaporina
I-SETit.Prx17-2-1:1:1	257	Peroxidasa 17
I-SETit.Prx3-1-1:1:2	258	Peroxidasa 3
I-SETit.SBD-1-1:1:2	259	Proteína del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond
I-SETit.SBD-2-1:1:1	260	Proteína del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond
I-SETit.SBD-3-1:1:2	261	Proteína del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond
I-SETit.TubA2 1-1:1:1	262	Tubulina A2
I-SETit.TubA2 2-1:1:1	263	Tubulina A2
I-SETit.TubA2 3-1:1:1	264	Tubulina A2
I-SETit.TubA3 1-1:1:1	265	Tubulina A3
I-SETit.TubA3 2-1:1:1	266	Tubulina A3
I-SETit.Wx1-1-1:1:2	267	Posible sintasa de almidón unida a gránulos
T-SETit.Act1-1:1:1	268	Actina 1
T-SETit.Act8-1:1:1	269	Actina 8
T-SETit.Ams1-1:1:1	270	S-adenosilmetionina sintetasa 1
T-SETit.Ctpt-1:1:2	271	Translocador de triosa fosfato/fosfato, precursor de cloroplasto
T-SETit.Fba-1:1:1	272	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Fnr-1:1:1	273	Ferredoxina-NADP+ reductasa
T-SETit.Mes2-1:1:1	274	Metionina sintasa 2
T-SETit.Ntr-1:1:1	275	Transportador de nitrito
T-SETit.Sus2-1:1:1	276	Sacarosa sintasa 2
GOI-TS-APX	277	Ascorbato peroxidasa
GOI-TS-APX:1:2	278	Ascorbato peroxidasa
GOI-TS-APX2:1:1	279	Ascorbato peroxidasa
GOI-TS-CNT:1:2	280	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
GOI-TS-DHDPS:1:2	281	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, de cloroplasto
GOI-TS-Fe-SD:1:1	282	Hierro-superoxidodismutasas, de cloroplasto
GOI-TS-PPR:1:1	283	Proteína que contiene repeticiones de pentatricopéptido, posible
TS-SETit.APG6-1:1:1	284	Proteinasa lítica de caseína de tipo proteína de choque térmico B3
TS-SETit.APX.2.ex1-1:1:1	285	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.APX.ex1-1:1:1	286	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.APXex2-1:1:2	287	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.APX2.ex2-1:1:1	288	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.APX3-1:1:1	289	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.ASA2-1:1:1	290	Subunidad alfa 2 de antranilato sintasa
TS-SETit.CC10-1:1:1	291	Subunidad de 10 Kd de chaperonina de cloroplasto
TS-SETit.CHoR1-1:1:1	292	Regulador de la homeostasis del calcio
TS-SETit.ClpD-1:1:1	293	Subunidad de unión a ATP de proteasa Clp dependiente de ATP
TS-SETit.CNT.ex1-1:1:1	294	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
TS-SETit.CNT.ex2-1:1:2	295	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
TS-SETit.CR88-1:1:1	296	Supuesta proteína de choque térmico
TS-SETit.DHDPS.Ex1-1:1:1	297	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, de cloroplasto
TS-SETit.DHDPS.Ex2-1:1:1	298	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, de cloroplasto
TS-SETit.Fe-SD.ex1-1:1:1	299	Hierro-superoxidodismutasas, de cloroplasto

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
TS-SETit.Fe-SD.ex2-1:1:1	300	Hierro-superoxidodismutasas, de cloroplasto
TS-SETit.G-typA-1:1:1	301	Proteína de unión a GTP typA
TS-SETit.HDh-1:1:1	302	Hidrolasa de tipo haloácido deshalogenasa
TS-SETit.IMP-1:1:1	303	Inositol-1-monofosfatasa, posible, de cloroplasto
TS-SETit.MDH-1:1:1	304	Posible NAD-malato deshidrogenasa
TS-SETit.PPR.ex1-1:1:1	305	Proteína que contiene repeticiones de pentatricopéptido, posible
TS-SETit.PPR.ex2-1:1:2	306	Proteína que contiene repeticiones de pentatricopéptido, posible
TS-SETit.PSPR-3-1:1:1	307	Proteína ribosómica 30S específica de plastidio 3
TS-SETit.RbcS 1-1:1:1	308	Subunidad pequeña de la RUBISCO
TS-SETit.RbcS 2-1:1:1	309	Subunidad pequeña de la RUBISCO
TS-SETit.RbcS 3-1:1:1	310	Subunidad pequeña de la RUBISCO
TS-SETit.RbcS 4-1:1:1	311	Subunidad pequeña de la RUBISCO
TS-SETit.ShkG-1:1:1	312	Precursor de la 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa
TS-SETit.SRP43-1:1:1	313	Proteína de 43 kDa de partícula de reconocimiento de señales, de cloroplasto
TS-SETit.TDh-1:1:1	314	Treonina deshidratasa biosintética, precursor de cloroplasto
TS-SETit.ThR-1:1:1	315	Tiorredoxina
TS-SETit.Wx1-1:1:1	316	Posible sintasa de almidón unida a gránulos
I-SETit.APX.2-1:1:1	317	Ascorbato peroxidasa
I-SETit.APX-1:1:1	318	Ascorbato peroxidasa
I-SETit.APX-1:1:2	319	Ascorbato peroxidasa
I-SETit.CNT.1-1:1:1	320	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
I-SETit.DHDPS_1-1:1:1	321	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, de cloroplasto
I-SETit.Fe-SD-1:1:1	322	Hierro-superoxidodismutasas, de cloroplasto
I-SETit.PPR-1:1:2	323	Proteína que contiene repeticiones de pentatricopéptido, posible
TS-SETit.APG6.pep	324	Proteinasa lítica de caseína de tipo proteína de choque térmico B3
TS-SETit.APX.2.pep	325	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.APX.pep	326	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.APX3.pep	327	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.ASA2.pep	328	Subunidad alfa 2 de antranilato sintasa
TS-SETit.CC10.pep	329	Subunidad de 10 Kd de chaperonina de cloroplasto
TS-SETit.CHoR1.pep	330	Regulador de la homeostasis del calcio
TS-SETit.ClpD.pep	331	Subunidad de unión a ATP de proteasa Clp dependiente de ATP
TS-SETit.CNT.pep	332	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
TS-SETit.CR88.pep	333	Supuesta proteína de choque térmico
TS-SETit.DHDPS.pep	334	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, de cloroplasto
TS-SETit.Fe-SD.pep	335	Hierro-superoxidodismutasas, de cloroplasto
TS-SETit.G-typA.pep	336	Proteína de unión a GTP typA
TS-SETit.HDh.pep	337	Hidrolasa de tipo haloácido deshalogenasa
TS-SETit.IMP.pep	338	Inositol-1-monofosfatasa, posible, de cloroplasto
TS-SETit.MDH.pep	339	Posible NAD-malato deshidrogenasa
TS-SETit.PPR.pep	340	Proteína que contiene repeticiones de pentatricopéptido, posible
TS-SETit.PSPR-3.pep	341	Proteína ribosómica 30S específica de plastidio 3
TS-SETit.RbcS 1.pep	342	Subunidad pequeña de la RUBISCO
TS-SETit.RbcS 2.pep	343	Subunidad pequeña de la RUBISCO
TS-SETit.RbcS 3.pep	344	Subunidad pequeña de la RUBISCO
TS-SETit.RbcS 4.pep	345	Subunidad pequeña de la RUBISCO
TS-SETit.ShkG.pep	346	Precursor de la 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa
TS-SETit.SRP43.pep	347	Proteína de 43 kDa de partícula de reconocimiento de señales, de cloroplasto
TS-SETit. TDh.pep	348	Treonina deshidratasa biosintética, precursor de cloroplasto
TS-SETit.ThR.pep	349	Tiorredoxina

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
TS-SETit.Wx1.pep	350	Posible sintasa de almidón unida a gránulos
E-FMV.35S-1:1:2	351	Potenciador FMV 35S
E-SETit.Mth-1:1:2	352	Metalotioneína
P-SETit.25509-1:1:1	353	Conglomerado 25509
P-SETit.25509-1:1:2	354	Conglomerado 25509
P-SETit.Act8-1:1:1	355	Actina 8
P-SETit.Act8-1:1:2	356	Actina 8
P-SETit.Act8-1:1:3	357	Actina 8
P-SETit.Act8-1:1:4	358	Actina 8
P-SETit.Act8-1:1:7	359	Actina 8
P-SETit.Act8-1:1:1:1	360	Actina 8
P-SETit.Aip-1:1:2	361	Proteína inducida por auxina
P-SETit.AKR-1:1:1	362	Aspartato cinasa reductasa
P-SETit.AKR-1:1:2	363	Aspartato cinasa reductasa
P-SETit.Alc2-1:1:1	364	Alfa-coixina
P-SETit.Ali1-1:1:1	365	Proteína inducida por aluminio
P-SETit.Ali 1-1:1:2	366	Proteína inducida por aluminio
P-SETit.Ali 1-1:1:4	367	Proteína inducida por aluminio
P-SETit.Cab3-1:1:1	368	Proteína 3 de unión a clorofila a/b
-SETit.Cab3-1:1:2	369	Proteína 3 de unión a clorofila a/b
P-SETit.cab6-1:1:1	370	Proteína 6 de unión a clorofila a/b
P-SETit.Cab6-1:1:1	371	Proteína 6 de unión a clorofila a/b
P-SETit.Cab6-1:1:2	372	Proteína 6 de unión a clorofila a/b
P-SETit.Cafeoil CoA metiltransferasa-1:1:1	373	Cafeoil CoA metiltransferasa
P-SETit.Cafeoil-CoA O-metiltransferasa-1:1:1	374	Cafeoil CoA metiltransferasa
P-SETit.Cafeoil-CoA O-metiltransferasa-a-1:1:1	375	Cafeoil CoA metiltransferasa
P-SETit.Ccoamt-1:1:1	376	Cafeoil CoA metiltransferasa
P-SETit. Chi-1:1:1	377	Quitinasa
P-SETit.quitinasa-1:1:1	378	Quitinasa
P-SETit. Quitinasa-1:1:1	379	Quitinasa
P-SETit. Quitinasa-1:1:2	380	Quitinasa
P-SETit.quitinasa-1:1:3	381	Quitinasa
P-SETit.Chl A/b III-1:1:1	382	Proteína 3 de unión a clorofila a/b
P-SETit.Chl a/b pre-1:1:1	383	Preproteína de unión a clorofila a/b
P-SETit.Citinasa de clase III-1:1:1	384	Citinasa de clase III
P-SETit.Citinasa de clase III-1:1:2	385	Citinasa de clase III
P-SETit.Citinasa de clase III-1:1:3	386	Citinasa de clase III
P-SETit.CLUS19108-1:1:1	387	Conglomerado 19108
P-SETit. CLUS882664-1:1:1:1	388	Conglomerado 882664
P-SETit.CLUS882664-1:1:1:2	389	Conglomerado 882664
P-SETit.Cp26-1:1:1	390	Proteína de cloroplasto-26
P-SETit. Cp26-1:1:2	391	Proteína de cloroplasto-26
P-SETit.CP29-1:1:1	392	Proteína de cloroplasto-29
P-SETit.CP29-1:1:2	393	Proteína de cloroplasto-29
P-SETit.CP29-1:1:3	394	Proteína de cloroplasto-29
P-SETit.CP29-1:1:5	395	Proteína de cloroplasto-29
P-SETit.Cyp78a-1:1:1	396	Cisteína proteasa-78a
P-SETit.Cys-1:1:1	397	Cisteína proteasa
P-SETit.Cys-1:1:4	398	Cisteína proteasa
P-SETit.Cys-1:1:5	399	Cisteína proteasa
P-SETit.DRP-1:1:1	400	Proteína sensible a la deshidratación
P-SETit.DRP-1:1:2	401	Proteína sensible a la deshidratación
P-SETit.DRP-B-1:1:1	402	Proteína sensible a la deshidratación
P-SETit.Dzs-1:1:1	403	Proteína de almacenamiento de zeína delta
P-SETit.Dzs-1:1:2	404	Proteína de almacenamiento de zeína delta
P-SETit.Dzs-1:1:3	405	Proteína de almacenamiento de zeína delta
P-SETit.ESTCLUS67 5389-2-1:1:1	406	Conglomerado 675389-2
P-SETit.ESTCLUS67 5389-2-1:1:2	407	Conglomerado 675389-2
P-SETit.FBP-ald-1:1:1	408	Fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
P-SETit.FM54-1:1:1	409	Conglomerado 1102871 1
P-SETit.FM63-1:1:1	410	Conglomerado 1019870 1
P-SETit.foxtailRcc3-1:1:1	411	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.FStr1-1:1:1	412	Flavonol 4-sulfotransferasa
P-SETit.FStr1-1:1:2	413	Flavonol 4-sulfotransferasa
P-SETit.FStr2-1:1:1	414	Flavonol 4-sulfotransferasa
P-SETit.Gahdp-1:1:1	415	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
P-SETit.Gahdp-1:1:2	416	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
P-SETit.gapdh-1:1:1	417	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
P-SETit.Gapdh2-1:1:1	418	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
P-SETit.Gapdh2-1:1:2	419	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
P-SETit.Glutatión S-transferasa-1:1:1	420	Glutatión S-transferasa
P-SETit.Glutatión S-transferasa-1:1:1	421	Glutatión S-transferasa
P-SETit.Glutatión S-transferasa-1:1:2	422	Glutatión S-transferasa
P-SETit.Glutatión S-transferasa-1:1:3	423	Glutatión S-transferasa
P-SETit.Grcw2-1:1:2	424	Proteína estructural 2 de la pared celular rica en glicina
P-SETit.Grf-1:1:1	425	Posible factor regulador del crecimiento
P-SETit.lfr-1:1:1	426	Isoflavona reductasa
P-SETit.lfr2-1:1:1	427	Isoflavona reductasa
P-SETit.Tipo isoflavona red-1:1:1	428	Tipo isoflavona reductasa
P-SETit.Tipo isoflavona reductasa-1:1:2	429	Tipo isoflavona reductasa
P-SETit.Isoflavona reductasa 2-1:1:1	430	Isoflavona reductasa
P-SETit.Tipo isoflavona reductasa-1:1:1	431	Tipo isoflavona reductasa
P-SETit.Isoflavona reductasa-1:1:1	432	Isoflavona reductasa
P-SETit.Isoflavona reductasa-1:1:1	433	Isoflavona reductasa
P-SETit.Isoflavona reductasa-1:1:2	434	Isoflavona reductasa
P-SETit.Isoflavona reductasa1-1:1:1	435	Isoflavona reductasa
P-SETit.Isoflavona reductasa 1-1:1:2	436	Isoflavona reductasa
P-SETit.LaDo-1:1:1	437	Leucoantocianidina dioxigenasa
P-SETit.Mt1-1:1:1	438	Proteína 1 de tipo metalotioneína
P-SETit.Mt1-1:1:3	439	Proteína 1 de tipo metalotioneína
P-SETit.Mth-1:1:1	440	Metalotioneína
P-SETit.Mth-1:1:2	441	Metalotioneína
P-SETit.Mth-1:1:4	442	Metalotioneína
P-SETit.MTLP-1:1:1	443	Proteína de tipo metalotioneína
P-SETit.MTLP-1:1:2	444	Proteína de tipo metalotioneína
P-SETit.MTLP-1:1:3	445	Proteína de tipo metalotioneína
P-SETit.Nadp-Me-1:1:1	446	Enzima NADP malato
P-SETit.Nadp-me-1:1:1	447	Enzima NADP malato
P-SETit.Transportador de nitrito-1:1:1	448	Transportador de nitrito
P-SETit.Transportador de nitrito-1:1:1	449	Transportador de nitrito
P-SETit.Transportador de nitrito-1:1:2	450	Transportador de nitrito
P-SETit.Transportador de nitrito-1:1:2	451	Transportador de nitrito
P-SETit.Transportador de nitrito-1:1:3	452	Transportador de nitrito
P-SETit.Transportador de nitrito-1:1:3	453	Transportador de nitrito
P-SETit.Nr1-1:1:1	454	Nitrato reductasa
P-SETit.Nr1-1:1:2	455	Nitrato reductasa
P-SETit.Nr1-1:1:3	456	Nitrato reductasa
P-SETit.Nr1-1:1:4	457	Nitrato reductasa
P-SETit.Nr1-1:1:5	458	Nitrato reductasa
P-SETit.NRED-1:1:1	459	Nitrato reductasa
P-SETit.Nrt2-1:1:1	460	Proteína de tipo transportador de nitrato
P-SETit.OMT2.1-1:1:1	461	O-metiltransferasa
P-SETit.OMT2.2-1:1:1	462	O-metiltransferasa
P-SETit.Omt3-1:1:1	463	O-metiltransferasa
P-SETit.Omt3-1:1:2	464	O-metiltransferasa
P-SETit.Omt4 2-1:1:1	465	O-metiltransferasa
P-SETit.OMt4-1:1:1	466	O-metiltransferasa
P-SETit. Peroxidasa-1:1:1	467	Peroxidasa
P-SETit.Peroxidasa-1:1:2	468	Peroxidasa

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
P-SETit.Pip2-1:1:1	469	Acuaporina
P-SETit.pip2-1:1:1	470	Acuaporina
P-SETit.Pip2-1-1-2	471	Acuaporina
P-SETit.pip2-1:1:2	472	Acuaporina
P-SETit.Pip2-3-1:1:2	473	Acuaporina
P-SETit.Pip2-3-1:1:3	474	Acuaporina
P-SETit.Pip2-3-1:1:4	475	Acuaporina
P-SETit.PIP2-5-1:1:1	476	Acuaporina
P-SETit.POX-1:1:1	477	Peroxidasa
P-SETit.Ppc-1:1:1	478	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P-SETit.Ppc-1:1:2	479	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P-SETit.Ppc-1:1:5	480	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P-SETit.Ppc-1:1:6	481	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P-SETit.Ppd-1:1:2	482	Piruvato ortofosfato dicinasa
P-SETit.Pro1-1:1:1	483	Prolamina 1
P-SETit.Pro2-1:1:1	484	Prolamina 2
P-SETit.Pro2-1:1:2	485	Prolamina 2
P-SETit.Prx17-1:1:1	486	Peroxidasa 17
P-SETit.Prx2-1:1:1	487	Peroxidasa 2
P-SETit.Prx2-1:1:2	488	Peroxidasa 2
P-SETit.Prx2-1:1:4	489	Peroxidasa 2
P-SETit.Prx3-1:1:1	490	Peroxidasa 3
P-SETit.Prx3-1:1:2	491	Peroxidasa 3
P-SETit.Prx3-1:1:5	492	Peroxidasa 3
P-SETit.Prx4-1:1:1	493	Peroxidasa 4
P-SETit.Prx47-1:1:1	494	Peroxidasa 47
P-SETit.Prx47-1:1:3	495	Peroxidasa 47
P-SETit.Prx72-1:1:1	496	Peroxidasa 72
P-SETit.PSIRC-1:1:1	497	Centro de reacción del fotosistema 1
P-SETit.Rbcs-1:1:2	498	Subunidad pequeña de la RUBISCO
P-SETit.Rcc3-1:1:12	499	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:13	500	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:14	501	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:15	502	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:2	503	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:3	504	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:4	505	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:5	506	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:6	507	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:7	508	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:8	509	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1-1-9	510	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.RUBP-1:1:1	511	RuBP-carboxilasa/oxigenasa
P-SETit.RUBP-pre-1:1:1	512	Precursor de RuBP-carboxilasa/oxigenasa
P-SETit.Srp-1:1:1	513	Proteína sensible a la tensión
P-SETit.Srp-1:1:3	514	Proteína sensible a la tensión
P-SETit.Tga6-1:1:1	515	Arquitectura de la gluma de teosinte
P-SETit.TGA6-1:1:1	516	Arquitectura de la gluma de teosinte
P-SETit.TGA6-1:1:2	517	Arquitectura de la gluma de teosinte
P-SETit.TIP-1:1:1	518	Proteína intrínseca de tonoplasto
P-SETit.Tip-1:1:2	519	Proteína intrínseca de tonoplasto
P-SETit.Tip-1:1:3	520	Proteína intrínseca de tonoplasto
P-SETit.Tip-1:1:5	521	Proteína intrínseca de tonoplasto
P-SETit.Tip-1:1:6	522	Proteína intrínseca de tonoplasto
P-SETit.Tub3A-1:1:1	523	Tubulina A3
P-SETit.TubA-1:1:1	524	Tubulina A
P-SETit.TubA-1:1:2	525	Tubulina A
P-SETit.TubA2-1-1:1:1	526	Tubulina A2
P-SETit.TubA2-1-1:1:4	527	Tubulina A2
P-SETit.TubA2-2-1:1:1	528	Tubulina A2
P-SETit.TubA2-2-1:1:2	529	Tubulina A2
P-SETit.TubA3-1:1:1	530	Tubulina A3

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
P-SETit.TubA3-1:1:2	531	Tubulina A3
P-SETit.Ubq 1-1:1:2	532	Ubiquitina 1
P-SETit.Ubq5-1:1:1	533	Ubiquitina 5
P-SETit.Ucc1-1:1:1	534	Uclacianina
P-SETit.Ucc1-1:1:3	535	Uclacianina
P-SETit.Ucc2-1:1:1	536	Uclacianina
L-SETit.25509-1:1:1	537	Conglomerado 25509
L-SETit.Act1-1:1:1	538	Actina 1
L-SETit.Act2-1:1:1	539	Actina 2
L-SETit.Act8-1:1:1	540	Actina 8
L-SETit.Actina-1:1:1	541	Actina
L-SETit.AKR-1:1:1	542	Aspartato cinasa reductasa
L-SETit.Cab3-1:1:2	543	Clorofila a/b
L-SETit.Cafeoil-CoA O-metiltransferasa-1:1:1	544	Cafeoil-CoA O-metiltransferasa
L-SETit. Cafeoil-CoAO-metiltransferasa-1:1:2	545	Cafeoil-CoA O-metiltransferasa
L-SETit.Ccoamt-1:1:1	546	Cafeoil-CoA O-metiltransferasa
L-SETit.Chi-1:1:1	547	Quitinasa
L-SETit. CP29-1:1:2	548	Proteína de cloroplasto-29
L-SETit.CP29-1:1:3	549	Proteína de cloroplasto-29
L-SETit.DRP-1:1:1	550	Proteína sensible a la deshidratación
L-SETit.DRP-1:1:2	551	Proteína sensible a la deshidratación
L-SETit.FStr1-1:1:1	552	Flavonol 4-sulfotransferasa
L-SETit.FStr1-1:1:2	553	Flavonol 4-sulfotransferasa
L-SETit.FStr1-1:1:3	554	Flavonol 4-sulfotransferasa
L-SETit.gapdh-1:1:1	555	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
L-SETit.Gapdh-1:1:1	556	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
L-SETit.Gr1-1:1:1	557	Posible factor regulador del crecimiento
L-SETit.Gr1-1:1:2	558	Posible factor regulador del crecimiento
L-SETit.Isoflavona reductasa 2-1:1:1	559	Isoflavona reductasa
L-SETit.Isoflavona reductasa 1-1:1:1	560	Isoflavona reductasa
L-SETit.MO4-1:1:1	561	O-metiltransferasa
L-SETit.Mth-1:1:1	562	Metalotioneína
L-SETit.Mth-1:1:2	563	Metalotioneína
L-SETit.MTLP-1:1:1	564	Proteína de tipo metalotioneína
L-SETit.MTLP-1:1:2	565	Proteína de tipo metalotioneína
L-SETit.Nadp-me-1:1:1	566	Enzima NADP malato
L-SETit.NADP-Me-1:1:1	567	Enzima NADP malato
L-SETit.Nr1-1:1:1	568	Nitrato reductasa
L-SETit.Nr1-1:1:2	569	Nitrato reductasa
L-SETit.Nr1-1:1:3	570	Nitrato reductasa
L-SETit.Nrt2-1:1:1	571	Nitrato reductasa
L-SETit.OM4-1:1:1	572	O-metiltransferasa
L-SETit.Pip2-3-1:1:2	573	Acuaporina
L-SETit.POX-1:1:1	574	Peroxidasa
L-SETit.Ppc-1:1:2	575	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
L-SETit.Ppc-1:1:3	576	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
L-SETit.Ppc-1:1:4	577	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
L-SETit.Ppdk-1:1:1	578	Piruvato ortofosfato dicinasa
L-SETit.Ppdk-1:1:3	579	Piruvato ortofosfato dicinasa
L-SETit.Pro2-1:1:1	580	Prolamina 2
L-SETit.Prx2-1:1:1	581	Peroxidasa 2
L-SETit.Prx4-1:1:1	582	Peroxidasa 4
L-SETit.Rcc3-1:1:3	583	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
L-SETit.TGA6-1:1:1	584	Arquitectura de la gluma de teosinte
L-SETit.TIP-1:1:1	585	Proteína intrínseca de tonoplasto
L-SETit.Tip-1:1:2	586	Proteína intrínseca de tonoplasto
L-SETit.TubA-1:1:1	587	Tubulina A
L-SETit.TubA-1:1:2	588	Tubulina A
I-SETit.14-3-3A-3-1:1:1	589	Proteína A de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3A-4-1:1:1	590	Proteína A de tipo 14-3-3

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
I-SETit.14-3-3A-5-1:1:1	591	Proteína A de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3B-3-1:1:1	592	Proteína B de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3B-4-1:1:1	593	Proteína B de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3B-5-1:1:1	594	Proteína B de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3C-3-1:1:1	595	Proteína C de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3C-4-1:1:1	596	Proteína C de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3C-5-1:1:1	597	Proteína C de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3D-1-1:1:1	598	Proteína D de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3D-3-1:1:1	599	Proteína D de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3D-4-1:1:1	600	Proteína D de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3D-4-1:1:2	601	Proteína D de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3D-5-1:1:1	602	Proteína D de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3E-3-1:1:1	603	Proteína E de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3E-4-1:1:1	604	Proteína E de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3E-5-1:1:1	605	Proteína E de tipo 14-3-3
I-SETit.14-3-3lp-1:1:1	606	Proteína de tipo 14-3-3
I-SETit.40S-7S-1_1-1:1:1	607	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-1_2-1:1:1	608	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-1_3-1:1:1	609	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-1_4-1:1:1	610	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-3_1-1:1:1	611	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-3_2-1:1:1	612	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-3_3-1:1:1	613	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.40S-7S-3_3p-1:1:1	614	Proteína ribosómica de 40S S7
I-SETit.60S_L10A1-1-1:1:1	615	Proteína ribosómica de 60S L10A1
I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:1	616	Proteína ribosómica de 60S L10A1
I-SETit.60S_L10A1-3-1:1:1	617	Proteína ribosómica de 60S L10A1
I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:1	618	Proteína ribosómica de 60S L10A1
I-SETit.Act1-1:1:1	619	Actina 1
I-SETit.Act1-1:1:2	620	Actina 1
I-SETit.Act1-1:1:3	621	Actina 1
I-SETit.Act1-1:1:4	622	Actina 1
I-SETit.Act2-1:1:1	623	Actina 2
I-SETit.Act3-1:1:1	624	Actina 3
I-SETit.Act3-1:1:2	625	Actina 3
I-SETit.Act4-1:1:1	626	Actina 4
I-SETit.Act4-1:1:2	627	Actina 4
I-SETit.Act6-1:1:1	628	Actina 6
I-SETit.Act6-1:1:2	629	Actina 6
I-SETit.Act6-1:1:3	630	Actina 6
I-SETit.Act6-1:1:4	631	Actina 6
I-SETit.Act7-1:1:1	632	Actina 7
I-SETit.Act7-1:1:2	633	Actina 7
I-SETit.Act7-1:1:3	634	Actina 7
I-SETit.Act8-1:1:1	635	Actina 8
I-SETit.Actin1-1:1:1	636	Actina 1
I-SETit.Arp1_1-1:1:1	637	Proteína ribosómica ácida de 60S P2A, posible, expresada
I-SETit.Arp1_1-1:1:2	638	Proteína ribosómica ácida de 60S P2A, posible, expresada
I-SETit.Arp1_1-1:1:3	639	Proteína ribosómica ácida de 60S P2A, posible, expresada
I-SETit.Arp1_2-1:1:1	640	Proteína ribosómica ácida de 60S P2A, posible, expresada
I-SETit.Arp1_2-1:1:2	641	Proteína ribosómica ácida de 60S P2A, posible, expresada
I-SETit.Arp1_3-1:1:1	642	Proteína ribosómica ácida de 60S P2A, posible, expresada
I-SETit.Arp1_3-1:1:2	643	Proteína ribosómica ácida de 60S P2A, posible, expresada
I-SETit.ASA2-3-1:1:1	644	Subunidad alfa 2 de antranilato sintasa
I-SETit.CNT-1-1:1:1	645	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
I-SETit.CNT-2-1:1:1	646	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
I-SETit.CNT-3-1:1:1	647	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
I-SETit.Cys-1-1:1:1	648	Cisteína proteasa
I-SETit.Cys-2-1:1:1	649	Cisteína proteasa
I-SETit.Cys-3-1:1:1	650	Cisteína proteasa
I-SETit.DHDPS-1-1:1:1	651	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, de cloroplasto
I-SETit.DHDPS-2-1:1:1	652	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, de cloroplasto
I-SETit.DnaJ 1-1:1:1	653	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaJ2-1:1:1	654	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaJ2-1:1:2	655	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaJ3-2-1:1:1	656	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK10-1:1:1	657	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK 10-1:1:2	658	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK 1-1:1:1	659	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK1-1:1:2	660	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK1-1:1:3	661	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK2-1:1:1	662	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK5-1:1:1	663	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK5-1:1:2	664	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK6-1:1:1	665	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK6-1:1:2	666	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK8-1:1:1	667	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK8-1:1:2	668	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK8-1:1:3	669	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK9-1:1:1	670	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK9-1:1:2	671	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK9-1-1:1:1	672	Proteína de choque térmico
I-SETit.eEF1a 1-1:1:1	673	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 1-1:1:2	674	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 2-1:1:1	675	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 2-1:1:2	676	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 3-1:1:1	677	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 3-1:1:2	678	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 4-1:1:1	679	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 4-1:1:2	680	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 5-1:1:1	681	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 5-1:1:2	682	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 6-1:1:1	683	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 6-1:1:2	684	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 7-1:1:1	685	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 7-1:1:2	686	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1a 7-1:1:3	687	Factor de elongación 1 alfa
I-SETit.eEF1g 1-1:1:1	688	Factor de elongación 1 gamma
I-SETit.eEF1g 2-1:1:1	689	Factor de elongación 1 gamma
I-SETit.eEF1g 2-1:1:2	690	Factor de elongación 1 gamma
I-SETit.eEF1g 2-1:1:3	691	Factor de elongación 1 gamma
I-SETit.eEF1g 3-1:1:1	692	Factor de elongación 1 gamma
I-SETit.eEF1g 3-1:1:2	693	Factor de elongación 1 gamma
I-SETit.eEF1g 4-1:1:1	694	Factor de elongación 1 gamma
I-SETit.eEF1g 4-1:1:2	695	Factor de elongación 1 gamma
I-SETit.eEF1g3-2-1:1:1	696	Factor de elongación 1 gamma
I-SETit.eEF1g3-3-1:1:1	697	Factor de elongación 1 gamma
I-SETit.eEF2-1:1:1	698	Factor de elongación 2
I-SETit.eEF2-1:1:2	699	Factor de elongación 2
I-SETit.eEF2-1:1:3	700	Factor de elongación 2
I-SETit.eIF5A1-2-1:1:1	701	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-3-1:1:1	702	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-4-1:1:1	703	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-5-1:1:1	704	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-1-1:1:1	705	Factor de elongación 5 alfa

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
I-SETit.eIF5A2-2-1:1:1	706	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-2-1:1:2	707	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-3-1:1:1	708	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-4-1:1:1	709	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-5-1:1:1	710	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-2-1:1:1	711	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-3-1:1:1	712	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-4-1:1:1	713	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-5-1:1:1	714	Factor de elongación 5 alfa
I-SETit.Ein3-1:1:1	715	Proteína de tipo 3 insensible al etileno
I-SETit.EIN3-1:1:1	716	Proteína de tipo 3 insensible al etileno
I-SETit.GAD 1-1:1:1	717	UDP-ácido glucurónico descarboxilasa
I-SETit.GAD 2-1:1:1	718	UDP-ácido glucurónico descarboxilasa
I-SETit.GAD 3-1:1:1	719	UDP-ácido glucurónico descarboxilasa
I-SETit.GAD 4-1:1:1	720	UDP-ácido glucurónico descarboxilasa
I-SETit.Grf1-1:1:1	721	Posible factor regulador del crecimiento
I-SETit.Grf2-1:1:1	722	Posible factor regulador del crecimiento
I-SETit.Grf3-1:1:1	723	Posible factor regulador del crecimiento
I-SETit.Grp-1:1:1	724	Proteína de unión a ARN rica en glicina
I-SETit.HDh-1:1:1	725	Acuaporina
I-SETit.I-SETit.PIP1-1 2-1:1:1	726	Acuaporina
I-SETit.I-SETit.PIP1-1 3-1:1:1	727	Acuaporina
I-SETit. I-SETit. PIP2-2 2-1:1:1-1:1:1	728	Acuaporina
I-SETit.LSm80-1-1:1:1	729	Proteína de tipo Sm asociada a ARNnp U6 LSm80
I-SETit.LSm80-2-1:1:1	730	Proteína de tipo Sm asociada a ARNnp U6 LSm80
I-SETit.LSm80-3-1:1:1	731	Proteína de tipo Sm asociada a ARNnp U6 LSm80
I-SETit.LSm80-4-1:1:1	732	Proteína de tipo Sm asociada a ARNnp U6 LSm80
I-SETit.LSm8-1-1:1:1	733	Proteína de tipo Sm asociada a ARNnp U6 LSm8
I-SETit.LSm8-4-1:1:1	734	Proteína de tipo Sm asociada a ARNnp U6 LSm8
I-SETit.MDH-1:1:1	735	Posible NAD-malato deshidrogenasa
I-SETit.Nab-1:1:1	736	Proteína de unión a ácido nucleico
I-SETit.NAB-1:1:1	737	Proteína de unión a ácido nucleico
I-SETit.NADP-Me-1:1:1	738	Enzima NADP malato
I-SETit.NADP-Me-1:1:2	739	Enzima NADP malato
I-SETit.PGK1-1:1:1	740	Fosfoglicerato cinasa
I-SETit.PGK1-1:1:2	741	Fosfoglicerato cinasa
I-SETit.Pgk1-1-1:1:1	742	Fosfoglicerato cinasa
I-SETit.Pgk1-2-1:1:1	743	Fosfoglicerato cinasa
I-SETit.PGK3 1-1:1:1	744	Fosfoglicerato cinasa
I-SETit.PIP1 3 2-1:1:1	745	Acuaporina
I-SETit.PIP1-1 2-1:1:1	746	Acuaporina
I-SETit.PIP1-1 3-1:1:1	747	Acuaporina
I-SETit.PIP1-3 3-1:1:1	748	Acuaporina
I-SETit.PIP1-4 3-1:1:1	749	Acuaporina
I-SETit.PIP2-2 2-1:1:1	750	Acuaporina
I-SETit.PIP2-2 3-1:1:1	751	Acuaporina
I-SETit.PIP2-5 2-1:1:1	752	Acuaporina
I-SETit.PIP2-5 3-1:1:1	753	Acuaporina
I-SETit.PPR-1:1:1	754	Proteína que contiene repeticiones de pentatricopéptido
I-SETit.Prx17-1-1:1:1	755	Peroxidasa 17
I-SETit.Prx3-1-1:1:1	756	Peroxidasa 3
I-SETit.Prx3-2-1:1:1	757	Peroxidasa 3
I-SETit.PSRP-3-1:1:1	758	Proteína ribosómica de plastidio y cianobacteriana
I-SETit.RbcS 1-1:1:1	759	Subunidad pequeña de la RUBISCO
I-SETit.RbcS 2-1:1:1	760	Subunidad pequeña de la RUBISCO
I-SETit.RbcS 3-1:1:1	761	Subunidad pequeña de la RUBISCO
I-SETit.RbcS 4-1:1:1	762	Subunidad pequeña de la RUBISCO
I-SETit.Rps7-2 2-1:1:1	763	Proteína de la familia 40S-7S-2
I-SETit.Rps7-2 3-1:1:1	764	Proteína de la familia 40S-7S-2
I-SETit.Rps7-2 4-1:1:1	765	Proteína de la familia 40S-7S-2

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
I-SETit.SBD-1-1:1:1	766	Proteína del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond
I-SETit.SBD-3-1:1:1	767	Proteína del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond
I-SETit.SBS-2-1:1:1	768	Proteína del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond
I-SETit.SETit.eEF1g 4-1:1:1	769	Factor de elongación 1 gamma
I-SETit.ThioR-1:1:1	770	Tiorreductasa
I-SETit.TubA2 3-1:1:2	771	Tubulina A2
I-SETit.TubA2-1:1:1	772	Tubulina A2
I-SETit.TubA2-2-1:1:1	773	Tubulina A2
I-SETit.TubA2-3-1:1:1	774	Tubulina A2
I-SETit.TubA3 1-1:1:2	775	Tubulina A3
I-SETit.TubA3 2-1:1:2	776	Tubulina A3
I-SETit.Ubq5-1:1:1	777	Ubiquitina 5
I-SETit.Wx1-1-1:1:1	778	Posible sintasa de almidón unida a gránulos
T-SETit.36384-1:1:1	779	Conglomerado 36384
T-SETit.37025-1:1:1	780	Conglomerado 37025
T-SETit.37470-1:1:1	781	Conglomerado 37470
T-SETit.Ams2-1:1:1	782	S-adenosilmetionina sintetasa 2
T-SETit.Atps-1:1:1	783	Subunidad gamma de ATP sintasa
T-SETit.Cab-1:1:1	784	Proteína de unión a clorofila a/b
T-SETit.Cab 1-1:1:1	785	Proteína de unión a clorofila a/b
T-SETit.Ctpt-1:1:1	786	Translocador de triosa fosfato/fosfato, precursor de cloroplasto
T-SETit.DnaK-1:1:1	787	Proteína de choque térmico
T-SETit.Fba-1:1:2	788	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Fba-1:1:3	789	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Fba-1:1:4	790	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Gapdh-1:1:1	791	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
T-SETit.MES2 nno-1:1:1	792	Metionina sintasa 2
T-SETit.Oep-1:1:1	793	Proteína generadora de oxígeno de 33 kDa
T-SETit.Pea-1:1:1	794	ATPasa exportadora de protones
T-SETit.Pod-1:1:1	795	Piruvato ortofosfato dicinasa
T-SETit.Ppc-1:1:1	796	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
T-SETit.Psi-K-1:1:1	797	Subunidad del centro de reacción del fotosistema I
T-SETit.Psi-L-1:1:1	798	Subunidad del centro de reacción del fotosistema I
T-SETit.Rfe-s-1:1:1	799	Rieske Fe-S
T-SETit. TubA-1:1:1	800	Tubulina A
T-contig00388	801	3' UTR de raíz
T-contig05482	802	3' UTR de raíz
T-contig08555	803	3' UTR de raíz
T-contig08556	804	3' UTR de raíz
T-contig09485	805	3' UTR de raíz
T-contig13749	806	3' UTR de raíz
T-contig16157	807	3' UTR de raíz
T-contig18936	808	3' UTR de raíz
T-contig18994	809	3' UTR de raíz
T-contig21387	810	3' UTR de raíz
T-contig23385	811	3' UTR de raíz
T-contig24188	812	3' UTR de raíz
T-contig24188	813	3' UTR de raíz
T-contig24832	814	3' UTR de raíz
T-contig24890	815	3' UTR de raíz
T-contig24916	816	3' UTR de raíz
T-contig25097	817	3' UTR de raíz
T-contig25509	818	3' UTR de raíz
T-contig25584	819	3' UTR de raíz
T-contig26532	820	3' UTR de raíz
T-contig28013	821	3' UTR de raíz
T-contig29922	822	3' UTR de raíz
T-contig34261	823	3' UTR de raíz

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
T-contig34311	824	3' UTR de raíz
T-contig34749	825	3' UTR de raíz
T-contig35408	826	3' UTR de raíz
T-contig35550	827	3' UTR de raíz
T-contig35785	828	3' UTR de raíz
T-contig35943	829	3' UTR de raíz
T-contig36050	830	3' UTR de raíz
T-contig36266	831	3' UTR de raíz
T-contig36378	832	3' UTR de raíz
T-contig36502	833	3' UTR de raíz
T-contig36728	834	3' UTR de raíz
T-contig36811	835	3' UTR de raíz
T-contig36883	836	3' UTR de raíz
T-contig37316	837	3' UTR de raíz
T-contig37476	838	3' UTR de raíz
T-contig37510	839	3' UTR de raíz
T-contig37704	840	3' UTR de raíz
T-contig37883	841	3' UTR de raíz
T-contig37920	842	3' UTR de raíz
T-contig37959	843	3' UTR de raíz
T-contig37976	844	3' UTR de raíz
T-contig38003	845	3' UTR de raíz
T-SETIT-28JUL09-CLUS3016_12	846	3' UTR de raíz
T-10SETIT-28JUL09-CLUS1332_4	847	3' UTR constitutivo
T-17SETIT-28JUL09-CLUS1910_15	848	3' UTR constitutivo
T-7SETIT-28JUL09-CLUS2844_11	849	3' UTR constitutivo
T-contig00006	850	3' UTR constitutivo
T-contig00142	851	3' UTR constitutivo
T-contig00191	852	3' UTR constitutivo
T-contig00205	853	3' UTR constitutivo
T-contig00242	854	3' UTR constitutivo
T-contig00263	855	3' UTR constitutivo
T-contig01883	856	3' UTR constitutivo
T-contig02157	857	3' UTR constitutivo
T-contig02856	858	3' UTR constitutivo
T-contig02883	859	3' UTR constitutivo
T-contig04253	860	3' UTR constitutivo
T-contig05397	861	3' UTR constitutivo
T-contig05720	862	3' UTR constitutivo
T-contig_10626	863	3' UTR constitutivo
T-contig10874	864	3' UTR constitutivo
T-contig_11193	865	3' UTR constitutivo
T-contig14970	866	3' UTR constitutivo
T-contig26892	867	3' UTR constitutivo
T-contig32186	868	3' UTR constitutivo
T-contig32187	869	3' UTR constitutivo
T-contig33439	870	3' UTR constitutivo
T-contig33682	871	3' UTR constitutivo
T-contig34270	872	3' UTR constitutivo
T-contig34378	873	3' UTR constitutivo
T-contig35132	874	3' UTR constitutivo
T-contig35270	875	3' UTR constitutivo
T-contig35388	876	3' UTR constitutivo
T-contig35412	877	3' UTR constitutivo
T-contig35488	878	3' UTR constitutivo
T-contig35982	879	3' UTR constitutivo
T-contig36384	880	3' UTR constitutivo
T-contig36588	881	3' UTR constitutivo
T-contig36702	882	3' UTR constitutivo
T-contig36980	883	3' UTR constitutivo
T-contig36992	884	3' UTR constitutivo
T-contig36993	885	3' UTR constitutivo

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
T-contig37025	886	3' UTR constitutivo
T-contig37162	887	3' UTR constitutivo
T-contig37351	888	3' UTR constitutivo
T-contig37386	889	3' UTR constitutivo
T-contig37448	890	3' UTR constitutivo
T-contig37456	891	3' UTR constitutivo
T-contig37638	892	3' UTR constitutivo
T-contig37732	893	3' UTR constitutivo
T-contig37897	894	3' UTR constitutivo
T-contig37927	895	3' UTR constitutivo
T-contig37962	896	3' UTR constitutivo
T-contig37980	897	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS11107_1	898	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS11705_1	899	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS11899_1	900	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS12698_2	901	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS13580_1	902	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1404_1	903	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS14743_1	904	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS181186_1	905	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS19095_1	906	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_13	907	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_14	908	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_16	909	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_17	910	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_18	911	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_19	912	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS2157_4	913	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS2166_1	914	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS243_3	915	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS3485_1	916	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS364_1	917	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS36567_1	918	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS42130_1	919	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS52844_1	920	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS7004_1	921	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS83_23	922	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS937_1	923	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS95524_1	924	3' UTR constitutivo

En la tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor Act8 (actina 8) de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor de actina 8 se proporciona en las figuras 1a a 1c. El promotor, P-SETit.Act8-1:1:5 (SEQ ID NO: 24) tiene una longitud de 1419 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Act8-1:1:6 (SEQ ID NO: 25) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Act8-1:1:5 (SEQ ID NO: 24) y tiene una longitud de 902 nucleótidos.

- 5 En la tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor Alc1 de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Alc1 se proporciona en las figuras 2a a 2c. El promotor, P-SETit.Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 28) tiene una longitud de 1577 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Alc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 29) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 28) y tiene una longitud de 412 nucleótidos.

- 10 En la tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor Cys de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Cys se proporciona en las figuras 3a a 3f. El promotor, P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45) tiene una longitud de 3277 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45) y tiene una longitud de 2020 nucleótidos.

- 15 En la tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor Dzs de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Dzs se proporciona en las figuras 4a a 4f. El promotor, P-SETit.Dzs-1:1:4 (SEQ ID NO: 47) tiene una longitud de 3508 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Dzs-1:1:4 (SEQ ID NO: 47) y tiene una longitud de 1008 nucleótidos.

- 20 En la tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor Gst de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Gst se proporciona en las figuras 5a a 5c. El promotor, P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) tiene una longitud de 1681 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) y tiene una longitud de 428 nucleótidos.

En la tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor lfr de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor lfr se proporciona en las figuras 6a a 6c. El promotor, P-SETit.lfr-1:1:2 (SEQ ID NO: 60) tiene una longitud de 1280 nucleótidos. El promotor, P-SETit.lfr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.lfr-1:1:2 (SEQ ID NO: 60) y tiene una longitud de 275 nucleótidos.

- 5 En la tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor Nrt2 de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Nrt2 se proporciona en las figuras 7a a 7d. El promotor, P-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 64) tiene una longitud de 1866 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 64) y tiene una longitud de 382 nucleótidos.

- 10 En la tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor Ppc de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Ppc se proporciona en las figuras 8a a 8e. El promotor, P-SETit.Ppc-1:1:3 (SEQ ID NO: 74) tiene una longitud de 2722 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Ppc-1:1:4 (SEQ ID NO: 75) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Ppc-1:1:3 (SEQ ID NO: 74) y tiene una longitud de 1882 nucleótidos.

- 15 En la tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor Prx3 de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Prx3 se proporciona en las figuras 9a a 9f. El promotor, P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) tiene una longitud de 3354 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) y tiene una longitud de 1908 nucleótidos.

- 20 En la tabla 1 se presentan tres variantes de tamaño del promotor Rcc3 de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Rcc3 se proporciona en las figuras 10a a 10f. El promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) tiene una longitud de 2062 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) y tiene una longitud de 2024 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) y tiene una longitud de 1563 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) y tiene una longitud de 915 nucleótidos.

- 25 En la tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor Ssp1 de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Ssp1 se proporciona en las figuras 11a a 11b. El promotor, P-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 93) tiene una longitud de 1128 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Ssp1-1:1:2 (SEQ ID NO: 94) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 93) y tiene una longitud de 479 nucleótidos.

- 30 En la tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor Tip de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Tip se proporciona en las figuras 12a a 12d. El promotor, P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) tiene una longitud de 2108 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 96) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) y tiene una longitud de 917 nucleótidos.

- 35 En la tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor TubA2-1 de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor TubA2-1 se proporciona en las figuras 13a a 13d. El promotor, P-SETit.TubA2-1:1:1:2 (SEQ ID NO: 98) tiene una longitud de 1593 nucleótidos. El promotor, P-SETit.TubA2-1:1:1:3 (SEQ ID NO: 99) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.TubA2-1:1:1:2 (SEQ ID NO: 98) y tiene una longitud de 856 nucleótidos.

- En la tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor Ubq1 de panizo. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Ubq1 se proporciona en las figuras 14a a 14c. El promotor, P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) tiene una longitud de 1492 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 103) está compuesto por una supresión 5' de P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) y tiene una longitud de 680 nucleótidos.

- 40 Pueden construirse composiciones derivadas de cualquiera de los promotores presentados como las SEQ ID NO: 23 a 105 y las SEQ ID NO: 353 a 536 que comprenden supresiones internas o 5' usando procedimientos conocidos en la técnica para mejorar la expresión, eliminando elementos que tienen efectos positivos o negativos sobre la expresión; o duplicando elementos que tienen efectos positivos o negativos sobre la expresión; o duplicando o eliminando elementos que tienen efectos específicos de tejido o célula sobre la expresión. Se pueden usar composiciones derivadas de cualquiera de los promotores presentados como las SEQ ID NO: 23 a 105 y las SEQ ID NO: 353 a 536 que comprenden supresiones 3' en las que el elemento de la secuencia TATA o una secuencia equivalente del mismo y la secuencia cadena abajo se eliminan, para producir elementos potenciadores. Se pueden realizar más supresiones para eliminar cualquier elemento que tenga efectos positivos o negativos; o específicos de tejido; o específicos de célula; o específicos de tiempo (tales como, pero sin limitación, ritmos circadianos) sobre la expresión. Cualquiera de los promotores presentados como las SEQ ID NO: 23 a 105 y las SEQ ID NO: 353 a 536 y los fragmentos o potenciadores derivados de los mismos se pueden usar para preparar composiciones de elementos quiméricos reguladores de la transcripción que comprenden cualquiera de los promotores presentados como las SEQ ID NO: 23 a 105 y las SEQ ID NO: 353 a 536 y los fragmentos o potenciadores derivados de los mismos unidos operativamente a otros potenciadores y promotores. La eficacia de las modificaciones, duplicaciones o supresiones descritas anteriormente sobre los aspectos de la expresión deseados de un transgén particular puede ensayarse empíricamente en ensayos de plantas estables y transitorios, ya que el efecto de dichas alteraciones en la composición del promotor nativo no es fácilmente predecible y requiere pruebas empíricas para validar dichos efectos.
- 55

Las secuencias líder (5' UTR) presentadas como las SEQ ID NO: 106 a 171 y las SEQ ID NO: 537 a 588 pueden comprender elementos reguladores o pueden adoptar estructuras secundarias que pueden tener un efecto sobre la transcripción o traducción de un transgén. Las secuencias líder presentadas como las SEQ ID NO: 106 a 171 y las SEQ ID NO: 537 a 588 se pueden usar para producir elementos reguladores quiméricos que alteran la transcripción o traducción de un transgén. Además, las secuencias líder presentadas como las SEQ ID NO: 106 a 171 y las SEQ ID NO: 537 a 588 se pueden usar para producir secuencias líder quiméricas que alteran la transcripción o traducción de un transgén.

Las composiciones derivadas de cualquiera de los intrones presentados como las SEQ ID NO: 172 a 267, las SEQ ID NO: 317 a 323 y las SEQ ID NO: 589 a 778 pueden comprender supresiones o duplicaciones internas de elementos reguladores en *cis*; o se puede usar alteraciones de las secuencias 5' y 3' que comprenden las uniones de corte y empalme de intrón/exón para mejorar la expresión o la especificidad de la expresión cuando se unen operativamente a un promotor + líder o un promotor quimérico + líder y una secuencia codificante. Se pueden realizar también alteraciones de las regiones 5' y 3' que comprenden la unión de corte y empalme de intrón/exón para reducir el potencial para la introducción de falsos codones de inicio y de terminación que se producen en el transcrito resultante tras el procesamiento y el corte y empalme del ARN mensajero. Los intrones se prueban empíricamente como se describe a continuación para determinar el efecto del intrón sobre la expresión de un transgén.

Ejemplo 2: Análisis de elementos reguladores que dirigen GUS en maíz transgénico

Se transformaron plantas de maíz con vectores de expresión en plantas que contenían los elementos reguladores de prueba que dirigían la expresión del transgén de la β -glucuronidasa (GUS) y las plantas resultantes se analizaron para determinar la expresión de la proteína GUS.

Las plantas de maíz se transformaron con las construcciones de expresión de GUS de plantas, enumeradas en la tabla 2, a continuación. Los elementos reguladores y los elementos reguladores quiméricos presentados en el ejemplo 1 se clonaron en un vector básico de expresión en planta usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Los vectores de expresión en plantas resultantes contenían una región del extremo derecho de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete transgénico para probar el elemento regulador o regulador quimérico compuesto por, un elemento regulador o regulador quimérico, unido operativamente a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente a una secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS) que poseía un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091) o sin intrón (GUS-1, SEQ ID NO: 1090), unido operativamente a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRTu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088) o la región de terminación 3' del gen de la proteína de transferencia de lípidos del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 1089); un segundo casete de selección del transgén usado para la selección de las células vegetales transformadas que confirió resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el grupo de elementos reguladores de la transcripción de actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098) o, como alternativa, el antibiótico kanamicina (dirigido por el grupo de elementos reguladores de la transcripción de actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098) y una región del extremo izquierdo de *A. tumefaciens*. Los plásmidos resultantes, pMON109728, pMON112215, pMON116789, pMON116816, pMON116818, pMON116820, pMON116829, pMON120698, pMON120699, pMON120700, pMON120701, pMON120702, pMON120703, pMON120704, pMON120705, pMON120706, pMON120709, pMON120710, pMON120711, pMON120712, pMON120713, pMON127440, pMON127441, pMON127442, pMON127443, pMON127444, pMON127445, pMON127446, pMON127447, pMON127448, pMON127449 y pMON132037 se usaron para transformar plantas de maíz.

Tabla 2. Construcciones de transformación de plantas binarias, elementos reguladores o reguladores quiméricos, GUS y 3' UTR.

Construcción	Elementos reguladores	GUS	3' UTR
pMON109728	EXP-FMV.35S-SETit.Tip (SEQ ID NO: 8) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 96) L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON112215	P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) L-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 161)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON1 16789	P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON116816	P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON116818	P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73) L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON1 16820	P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON1 16829	P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON120698	EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:a (SEQ ID NO: 6) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120699	EXP-FMV.35S-SETit.Gst:a (SEQ ID NO: 2) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120700	EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:b (SEQ ID NO: 7) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120701	EXP-FMV.35S-SETit.Pox (SEQ ID NO: 5) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73) L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120702	P-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35) L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120703	EXP-FMV.35S-SETit.Ccoamt (SEQ ID NO: 1) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35) L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120704	P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120705	EXP-FMV.35S-SETit.Gst:b (SEQ ID NO: 3) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120706	EXP-FMV.35S-SETit.Ifr (SEQ ID NO: 4) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120709	P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120710	P-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 64) L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120711	P-SETit.Pip2-1:1:3 (SEQ ID NO: 71) L-SETit.Pip2-1:1:1 (SEQ ID NO: 145)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120712	P-SETit.Ifr-1:1:2 (SEQ ID NO: 60) L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	GUS	3' UTR
pMON120713	P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127440	P-SETit.Ppc-1:1:3 (SEQ ID NO: 74) L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127441	P-SETit.Ppc-1:1:4 (SEQ ID NO: 75) L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127442	P-SETit.Gapdh2-1:1:3 (SEQ ID NO: 55) L-SETit.Gapdh2-1:1:1 (SEQ ID NO: 133)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127443	EXP-SETit.Ppdk-1:1 (SEQ ID NO: 14) P-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 76) L-SETit.Ppdk-1:1:4 (SEQ ID NO: 150) I-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 175) L-SETit.Ppdk-1:1:2 (SEQ ID NO: 149)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127444	P-SETit.CP29-1:1:4 (SEQ ID NO: 42) L-SETit.CP29-1:1:1 (SEQ ID NO: 124)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127445	P-SETit.Cab3-1:1:3 (SEQ ID NO: 33) L-SETit.Cab3-1:1:1 (SEQ ID NO: 114)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127446	P-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 86) L-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 159)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127447	P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87) L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127448	P-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 32) L-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 113)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127449	P-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 51) L-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 131)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON132037	EXP-SETit.Ubq1-1:1 (SEQ ID NO: 20) P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) I-SETit.Ubq 1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1

El vector de transformación de plantas, pMON109728 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Tip (SEQ ID NO: 8), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 96), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165). El vector de transformación de plantas, pMON112215 comprende el elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 161). El vector de transformación de plantas, pMON116789 comprende el elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON116816 comprende el elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON116818 comprende el elemento promotor, P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147). El vector de transformación de plantas, pMON116820 comprende el elemento promotor, P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135). El vector de transformación de plantas, pMON116829 comprende el elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON120698 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:a (SEQ ID NO: 6), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON120699 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Gst:a (SEQ ID NO: 2), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135). El vector de transformación de plantas, pMON120700 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:b (SEQ ID NO: 7), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON120701 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Pox (SEQ ID NO: 5), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147). El vector de transformación de plantas, pMON120702 comprende el elemento promotor, P-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116). El vector de transformación de plantas, pMON120703 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Ccoamt (SEQ ID NO: 1), que comprende además el elemento potenciador, E-

FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116). El vector de transformación de plantas, pMON120704 comprende el elemento promotor, P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135). El vector de transformación de plantas, pMON120705 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Gst:b (SEQ ID NO: 3), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135). El vector de transformación de plantas, pMON120706 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.lfr (SEQ ID NO: 4), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.lfr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136). El vector de transformación de plantas, pMON120709 comprende el elemento promotor, P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139). El vector de transformación de plantas, pMON120710 comprende el elemento promotor, P-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 64), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139). El vector de transformación de plantas, pMON120711 comprende el elemento promotor, P-SETit.Pip2-1:1:3 (SEQ ID NO: 71), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Pip2-1:1:1 (SEQ ID NO: 145). El vector de transformación de plantas, pMON120712 comprende el elemento promotor, P-SETit.lfr-1:1:2 (SEQ ID NO: 60), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136). El vector de transformación de plantas, pMON120713 comprende el elemento promotor, P-SETit.lfr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136). El vector de transformación de plantas, pMON127440 comprende el elemento promotor, P-SETit.Ppc-1:1:3 (SEQ ID NO: 74), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148). El vector de transformación de plantas, pMON127441 comprende el elemento promotor, P-SETit.Ppc-1:1:4 (SEQ ID NO: 75), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148). El vector de transformación de plantas, pMON127442 comprende el elemento promotor, P-SETit.Gapdh2-1:1:3 (SEQ ID NO: 55), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Gapdh2-1:1:1 (SEQ ID NO: 133). El vector de transformación de plantas, pMON127443 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.Ppdk-1:1 (SEQ ID NO: 14), elemento promotor, P-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 76), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ppdk-1:1:4 (SEQ ID NO: 150), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, L-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 175), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ppdk-1:1:2 (SEQ ID NO: 149). El vector de transformación de plantas, pMON127444 comprende el elemento promotor, P-SETit.CP29-1:1:4 (SEQ ID NO: 42), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.CP29-1:1:1 (SEQ ID NO: 124). El vector de transformación de plantas, elemento promotor pMON127445, P-SETit.Cab3-1:1:3 (SEQ ID NO: 33), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cab3-1:1:1 (SEQ ID NO: 114). El vector de transformación de plantas, pMON127446 comprende el elemento promotor, P-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 86), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 159). El vector de transformación de plantas, pMON127447 comprende el elemento promotor, P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160). El vector de transformación de plantas, pMON127448 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 32), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 113). El vector de transformación de plantas, pMON127449 comprende el elemento promotor, P-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 51), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 131). El vector de transformación de plantas, pMON132037 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 20), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177).

Las plantas de maíz se transformaron con construcciones de expresión de GUS de plantas, pMON109728, pMON112215, pMON116789, pMON116816, pMON116818, pMON116820, pMON116829, pMON120698, pMON120699, pMON120700, pMON120701, pMON120702, pMON120703, pMON120704, pMON120705, pMON120706, pMON120709, pMON120710, pMON120711, pMON120712, pMON120713, pMON127440, pMON127441, pMON127442, pMON127443, pMON127444, pMON127445, pMON127446, pMON127447, pMON127448, pMON127449 y pMON132037.

Las plantas se transformaron usando transformaciones mediadas por *Agrobacterium* conocidas por los expertos en la materia. En resumen, se extraen embriones de semillas de maíz LH244 de granos de maíz en desarrollo, esterilizados en superficie, aproximadamente de 9 a 13 días después de la polinización. Los embriones se cultivan conjuntamente con *Agrobacterium tumefaciens*, transformada con las construcciones de expresión de GUS durante 18 a 28 horas en la oscuridad. A continuación, los embriones se transfieren a medios selectivos y se cultivan en la oscuridad durante aproximadamente 3 semanas para inducir la formación de callos. Después de la inducción de callos, el tejido del callo procedente del embrión se transfiere a un medio nuevo y se cultiva bajo la luz durante 5 a 10 días. A continuación, el tejido del callo se transfiere a medios nuevos para inducir la formación de brotes. Después de 2 a 3 semanas, los brotes transformados se transfieren a un medio de enraizamiento y se cultivan para permitir la formación de raíces. Una vez que se haya producido suficiente formación de raíces, las plantas transformadas se transfieren al suelo y se transfieren al invernadero. Se seleccionan acontecimientos que contienen una o dos copias del casete transgénico para su estudio usando procedimientos de PCR en tiempo real conocidos por los expertos en la materia.

Se usó el análisis histoquímico de GUS para el análisis de expresión cualitativa de plantas transformadas. Se incubaron secciones tisulares completas con solución de tinción de GUS X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucuronido) (1 miligramo/mililitro) durante un periodo de tiempo adecuado, se enjuagaron y se inspeccionaron visualmente para determinar la coloración azul. La actividad GUS se determinó cualitativamente mediante inspección visual directa o inspección bajo un microscopio usando órganos y tejidos de plantas seleccionadas. Se inspeccionan las plantas R0 para determinar la expresión en las raíces y hojas.

Para el análisis cuantitativo, se extrajo la proteína total de tejidos seleccionados de plantas de maíz transformadas. Se usó un microgramo de proteína total con el sustrato fluorógeno 4-metileumbeliferil- β -D-glucuronido (MUG) en un volumen de reacción total de 50 microlitros. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), tiene fluorescencia máxima a pH elevado, cuando el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de una solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente. La fluorescencia se midió con excitación a 365 nm, emisión a 445 nm usando un Fluoromax-3 con Micromax Reader, con una anchura de rendija configurada para una excitación de 2 nm y una emisión de 3 nm.

La expresión promedio de GUS R₀ observada para cada transformación se presenta en la tabla 3 y 4 a continuación.

Tabla 3. Expresión promedio de GUS R₀ en hojas y raíces en plantas de maíz transgénicas, transformadas con la construcción enumerada.

Construcción	Elementos reguladores	Raíz V3	Raíz V7	Raíz VT	Hoja V3	Hoja V7	Hoja VT
pMON109728	EXP-FMV.35S-SETit.Tip (SEQ ID NO: 8) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 177) P-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 95) L-SETit. Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 163)	11,98	nd	14,78	423,85	nd	11,38
pMON112215	P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) L-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 161)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
pMON1 16789	P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	43,43	nd	363,90	19,09	12,16	6,58
pMON116816	P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	5,77	nd	0,00	35,02	nd	0,00
pMON116818	P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73) L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147)	8,10	nd	0,00	22,96	0,00	0,00
pMON1 16820	P-SETit. Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	0,00	nd	12,06	5,21	0,00	8,85
PMON116829	P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	20,67	nd	0,00	0,00	0,00	0,00
pMON120698	EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:a (SEQ ID NO: 6) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	0,00	nd	12,90	0,00	0,00	0,00

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Raíz V3	Raíz V7	Raíz VT	Hoja V3	Hoja V7	Hoja VT
pMON120699	EXP-FMV.35S-SETit.Gst:a (SEQ ID NO: 2) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit. Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) L-SETit. Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	19,42	nd	147,75	47,82	26,76	116,51
pMON120700	EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:b (SEQ ID NO: 7) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	nd	11,97	12,18	0,00	5,16	0,00
pMON120701	EXP-FMV.35S-SETit.Pox (SEQ ID NO: 5) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73) L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147)	10,42	35,53	22,82	0,00	0,00	0,00
pMON120702	P-SETit. Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35) L-SETit. Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116)	0,00	nd	14,98	0,00	0,00	8,81
pMON120703	EXP-FMV.35S-SETit.Ccoamt (SEQ ID NO: 1) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit. Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35) L-SETit. Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116)	9,79	nd	93,87	12,14	67,80	22,52
pMON120704	P-SETit. Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) L-SETit. Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	7,12	nd	24,05	0,00	8,78	0,00
pMON120705	EXP-FMV.35S-SETit.Gst:b (SEQ ID NO: 3) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit. Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) L-SETit. Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	19,48	nd	38,27	34,28	136,79	104,30

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Raíz V3	Raíz V7	Raíz VT	Hoja V3	Hoja V7	Hoja VT
pMON120706	EXP-FMV.35S-SETit.lfr (SEQ ID NO: 4) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.lfr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	25,62	nd	92,11	32,18	191,22	107,41
pMON120709	P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)	10,40	nd	7,20	0,00	0,00	0,00
pMON120710	P-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 64) L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)	17,29	nd	11,89	0,00	0,00	0,00
pMON120711	P-SETit.Pip2-1:1:3 (SEQ ID NO: 71) L-SETit.Pip2-1:1:1 (SEQ ID NO: 145)	168,44	36,18	14,61	22,48	0,00	7,04
pMON120712	P-SETit.lfr-1:1:2 (SEQ ID NO: 60) L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	64,92	nd	15,97	0,00	0,00	0,00
pMON120713	P-SETit.lfr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	0,00	nd	0,00	0,00	0,00	6,38
pMON127440	P-SETit.Ppc-1:1:3 (SEQ ID NO: 74) L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)	0,00	nd	0,47	0,00	0,00	37,59
pMON127441	P-SETit.Ppc-1:1:4 (SEQ ID NO: 75) L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)	0,00	0,00	0,00	101,10	521,14	179,12
pMON127442	P-SETit.Gapdh2-1:1:3 (SEQ ID NO: 55) L-SETit.Gapdh2-1:1:1 (SEQ ID NO: 133)	0,00	0,00	0,00	13,12	0,00	0,00
pMON127443	EXP-SETit.PpdK-1:1 (SEQ ID NO: 14) P-SETit.PpdK-1:1:1 (SEQ ID NO: 76) L-SETit.PpdK-1:1:4 (SEQ ID NO: 150) I-SETit.PpdK-1:1:1 (SEQ ID NO: 175) L-SETit.PpdK-1:1:2 (SEQ ID NO: 149)	0,00	0,00	5,66	32,56	21,04	58,48
pMON127444	P-SETit.CP29-1:1:4 (SEQ ID NO: 42) L-SETit.CP29-1:1:1 (SEQ ID NO: 124)	0,00	6,17	0,00	165,74	348,96	249,42
pMON127445	P-SETit.Cab3-1:1:3 (SEQ ID NO: 33) L-SETit.Cab3-1:1:1 (SEQ ID NO: 114)	<0,1	<0,1	<0,1	299,16	136,85	179,80
pMON127446	P-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 86) L-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 159)	0,00	0,00	0,00	101,30	83,44	110,81

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Raíz V3	Raíz V7	Raíz VT	Hoja V3	Hoja V7	Hoja VT
pMON127447	P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87) L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160)	0,00	22,74	18,69	160,14	172,65	264,89
pMON127448	P-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 32) L-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 113)	0,16	0,00	0,00	158,08	109,59	48,01
pMON127449	P-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 51) L-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 131)	<0,1	<0,1	<0,1	81,41	82,57	83,95
pMON132037	EXP-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 20) P-SETit.Ubq 1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)	0,00	28,54	57,31	57,95	36,71	45,62

El nivel promedio de expresión de GUS entre las construcciones varió. Las construcciones que demostraron el nivel más alto de expresión en raíz, en particular en la etapa VT, fueron: pMON116789 ((P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) + L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)); pMON120699 ((EXP-FMV.35S-SETit.Gst:a (SEQ ID NO: 2), que comprende E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) + L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)); pMON120703 ((EXP-FMV.35S-SETit.Ccoamt (SEQ ID NO: 1), que comprende E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35) + L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116)); pMON120706 ((EXP-FMV.35S-SETit.lfr (SEQ ID NO: 4) que comprende E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.lfr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) + L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)) y pMON132037 ((EXP-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 20) que comprende P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) + L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) + I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)).

Las construcciones que demostraron el nivel más alto de expresión en hojas fueron: pMON127447 ((P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87) + L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160)); pMON127444 ((P-SETit.CP29-1:1:4 (SEQ ID NO: 42) + L-SETit.CP29-1:1:1 (SEQ ID NO: 124)); pMON127445 ((P-SETit.Cab3-1:1:3 (SEQ ID NO: 33) + L-SETit.Cab3-1:1:1 (SEQ ID NO: 114)); pMON127441 ((P-SETit.Ppc-1:1:4 (SEQ ID NO: 75) + L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)); pMON120699 ((EXP-FMV.35S-SETit.Gst:a (SEQ ID NO: 2) que comprende E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) + L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)); pMON127446 ((P-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 86) + L-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 159)); pMON120706 ((EXP-FMV.35S-SETit.lfr (SEQ ID NO: 4) que comprende E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.lfr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) + L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)); pMON120705 ((EXP-FMV.35S-SETit.Gst:b (SEQ ID NO: 3) que comprende E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) + L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)) y pMON127449 ((P-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 51) + L-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 131)).

Tabla 4. Expresión promedio de GUS R₀ en antera, estigma, endospermo y embrión en plantas de maíz transgénicas, transformadas con la construcción enumerada.

Construcción	Elementos reguladores	Antera VT	Estigma VT	Embrión 21 DAP	Endospermo 21 DAP
pMON109728	EXP-FMV.35S-SETit.Tip (SEQ ID NO: 8) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 177) P-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 95) L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 163)	nd	74,07	nd	nd

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Antera VT	Estigma VT	Embrión 21 DAP	Endospermo 21 DAP
pMON1 12215	P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) L-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 161)	nd	nd	nd	nd
pMON1 16789	P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	289,88	11,83	nd	nd
pMON116816	P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	9,66	0,00	17,06	20,16
pMON1 16818	P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73) L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147)	0,00	10,12	0,00	0,00
pMON1 16820	P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	19,62	8,08	14,09	15,25
PMON1 16829	P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	8,58	0,00	0,00	12,52
pMON120698	EXP-FMV. 35S-SETit. Rcc3:a (SEQ ID NO: 6) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	0,00	0,00	13,62	23,07
pMON120699	EXP-FMV. 35S-SETit. Gst: a (SEQ ID NO: 2) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	41,63	21,74	27,03	92,79
pMON120700	EXP-FMV. 35S-SETit. Rcc3: b (SEQ ID NO: 7) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	7,65	0,00	0,00	11,30
pMON120701	EXP-FMV.35S-SETit.Pox (SEQ ID NO: 5) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73) L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147)	55,20	77,97	0,00	10,70
pMON120702	P-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35) L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116)	33,96	0,00	0,00	6,93

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Antera VT	Estigma VT	Embrión 21 DAP	Endospermo 21 DAP
pMON120703	EXP-FMV.35S-SETit.Ccoamt (SEQ ID NO: 1) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35) L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116)	22,01	36,65	9,23	28,99
pMON120704	P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) L-SETit. Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	16,43	0,00	nd	nd
pMON 120705	EXP-FMV. 35S-SETit. Gst: b (SEQ ID NO: 3) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	156,37	46,06	39,48	82,83
pMON120706	EXP-FMV.35S-SETit.lfr (SEQ ID NO: 4) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.lfr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	77,35	307,35	14,27	100,43
pMON120709	P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)	6,90	132,25	138,75	20,39
pMON120710	P-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 64) L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)	8,60	0,00	12,49	6,52
pMON120711	P-SETit.Pip2-1:1:3 (SEQ ID NO: 71) L-SETit.Pip2-1:1:1 (SEQ ID NO: 145)	15,13	6,65	10,49	0,00
pMON120712	P-SETit.lfr-1:1:2 (SEQ ID NO: 60) L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	9,64	0,00	8,26	0,00
pMON120713	P-SETit.lfr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	11,02	0,00	23,91	5,94
pMON127440	P-SETit.Ppc-1:1:3 (SEQ ID NO: 74) L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)	18,44	1,15	0,00	0,00
pMON127441	P-SETit.Ppc-1:1:4 (SEQ ID NO: 75) L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)	181,79	0,00	4,10	1,17
pMON127442	P-SETit.Gapdh2-1:1:3 (SEQ ID NO: 55) L-SETit.Gapdh2-1:1:1 (SEQ ID NO: 133)	28,05	0,00	155,68	400,86

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Antera VT	Estigma VT	Embrión 21 DAP	Endospermo 21 DAP
pMON127443	EXP-SETit.Ppdk-1:1 (SEQ ID NO: 14) P-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 76) L-SETit.Ppdk-1:1:4 (SEQ ID NO: 150) I-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 175) L-SETit.Ppdk-1:1:2 (SEQ ID NO: 149)	0,00	0,00	2,62	0,67
pMON127444	P-SETit.CP29-1:1:4 (SEQ ID NO: 42) L-SETit.CP29-1:1:1 (SEQ ID NO: 124)	87,67	24,63	0,00	0,00
pMON127445	P-SETit.Cab3-1:1:3 (SEQ ID NO: 33) L-SETit.Cab3-1:1:1 (SEQ ID NO: 114)	35,79	35,94	<0,1	<0,1
pMON127446	P-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 86) L-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 159)	56,44	194,45	1,64	3,24
pMON127447	P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87) L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160)	102,30	125,45	3,25	6,58
pMON127448	P-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 32) L-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 113)	61,33	22,61	2,32	4,47
pMON127449	P-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 51) L-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 131)	12,62	<0,1	<0,1	<0,1
pMON132037	EXP-SETit.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 20) P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)	131,65	85,35	59,09	67,31

El nivel promedio de expresión de GUS en la semilla y los tejidos reproductivos varió entre las construcciones. Se observaron niveles mayores de expresión en anteras en la etapa VT para pMON116789 ((P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) + L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)); pMON127441 ((P-SETit.Ppc-1-1-4 (SEQ ID NO: 75) + L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)); pMON120705 ((EXP-FMV.35S-SETit.Gst:b (SEQ ID NO: 3) que comprende E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) + L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)); pMON132037 ((EXP-SETit.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 20) que comprende P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) + L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) + I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)); pMON127447 ((P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87) + L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160)); pMON127444 ((P-SETit.CP29-1:1:4 (SEQ ID NO: 42) + L-SETit.CP29-1:1:1 (SEQ ID NO: 124)) y pMON120706 ((EXP-FMV.35S-SETit.Ifr (SEQ ID NO: 4) que comprende E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) + L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)).

Los niveles más altos de expresión promedio de GUS en el estigma se observaron en plantas transformadas con pMON120706 ((EXP-FMV.35S-SETit.Ifr (SEQ ID NO: 4) que comprende E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) + L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)); pMON127446 ((P-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 86) + L-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 159)); pMON120709 ((P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) + L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)); pMON127447 ((P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87) + L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160)) y pMON132037 ((EXP-SETit.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 20) que comprende P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) + L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) + I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)). Se observó la expresión promedio de GUS en el embrión en desarrollo 21 DAP en plantas transformadas con pMON127442 ((P-SETit.Gapdh2-1:1:3 (SEQ ID NO: 55) + L-SETit.Gapdh2-1:1:1 (SEQ ID NO: 133)); pMON120709 ((P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) + L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)); pMON132037 ((EXP-SETit.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 20) que comprende P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) + L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) + I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)).

20) que comprende P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) + L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) + I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177); pMON120705 ((EXP-FMV.35S-SETit.Gst:b (SEQ ID NO: 3) que comprende E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) + L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)) y pMON120699 ((EXP-FMV.35S-SETit.Gst:a (SEQ ID NO: 2) que comprende E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) + L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)). La expresión promedio de GUS también fue mayor en plantas transformadas con pMON127442 ((P-SETit.Gapdh2-1:1:3 (SEQ ID NO: 55) + L-SETit.Gapdh2-1:1:1 (SEQ ID NO: 133)) y pMON120709 ((P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) + L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139))

Las plantas transformadas con los vectores de expresión de GUS, pMON112215 ((P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) + L-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 161)) se cruzaron con plantas LH244 no transformadas para producir una población F1 de transformantes. Se midieron niveles de expresión de GUS en tejidos seleccionados durante el transcurso del desarrollo. Los tejidos F1 usados para este estudio incluyeron: embrión de semilla hidratada, endospermo de semilla hidratada, raíz (3 días después de la germinación), coleóptilos (3 días después de la germinación), raíz V3, hoja V3, raíz V7, hoja madura V7, raíz seminal VT (en el momento de formación de la panícula, antes de la reproducción), entrenudo VT, mazorca VT, antera VT, polen VT, estigma VT, grano 7 días después de la polinización, embrión 21 días después de la polinización, endospermo 21 días después de la polinización, embrión 35 días después de la polinización, endospermo 35 días después de la polinización.

Se indujo tensión por sequía en plantas V3 Ro y en plantas V3 F1 reteniendo el riego durante 4 días, lo que permitió reducir el contenido de agua en al menos un 50 % del contenido de agua original de la planta completamente regada. El protocolo de sequía comprendía esencialmente las siguientes etapas. Se privó de agua a las plantas de la etapa V3. A medida que una planta de maíz experimenta sequía, la forma de la hoja cambia de la apariencia sana y desplegada habitual a una hoja que muestra un pliegue en el haz vascular de la nervadura media y que aparece en forma de V cuando se observa desde la punta de la hoja hasta el tallo. Este cambio en la morfología generalmente comenzó a ocurrir aproximadamente 2 días después del cese del riego y en experimentos anteriores se ha mostrado que estaba asociado con una pérdida de agua de aproximadamente 50 % medido por el peso de las macetas antes del cese del riego y el peso de las macetas cuando se observó morfología de enrollamiento de la hoja en plantas sin regar. Se consideró que las plantas estaban en condiciones de sequía, cuando las hojas mostraron marchitamiento como lo demuestra un enrollamiento hacia adentro (en forma de V) de la hoja. Este nivel de tensión se considera una forma de tensión subletal. Se tomaron muestras de hojas de control de cada planta para la prueba de GUS antes de la inducción de la sequía. A continuación se indujo la sequía (indicada como "Des" en la tabla 5 a continuación) y una vez que cada planta demostró la inducción de la sequía como se ha definido anteriormente, la planta fue destruida para adquirir muestras tanto de raíces como de hojas. Los niveles de expresión de GUS en las hojas se compararon con las muestras de tejido de control de las mismas plantas antes de la sequía. Para plantas de generación Ro, se utilizaron catorce plantas para cada vector. Para el análisis de F1, se usaron ocho plantas para cada vector y se tomaron medidas de GUS como se ha descrito anteriormente. Cuatro de las plantas F1 se destruyeron para muestreo tisular para el ensayo de GUS (Des) después de la inducción de sequía. Se permitió que las otras dos plantas F1 se recuperaran y después se muestrearon destructivamente para determinar si el patrón de expresión de GUS en recuperación era el mismo que antes de que se impusiera la sequía.

Además de la sequía, las plántulas en germinación F1 y las plantas en etapa V3 F1 transformadas con los vectores presentados en la tabla 2 también se expusieron a condiciones de frío para determinar si los elementos reguladores y los elementos reguladores quiméricos demostraban expresión de GUS inducida por frío. Sesenta semillas, que comprendían 6 semillas de cada uno de 10 acontecimientos de transformación para cada elemento regulador o elemento regulador quimérico, se probaron para determinar la inducción de la expresión génica en condiciones frías. Las semillas se hicieron germinar en placas de Petri sobre papel de filtro saturado de agua. Tres días después de la germinación, las plántulas se expusieron a tensión por frío colocando las placas de Petri que contenían las plántulas germinadas en una cámara de cultivo oscura ajustada a 10 grados Celsius durante 24 horas. Al final del periodo de 24 horas, se tomaron muestras de los tejidos de la raíz y los coleóptilos para determinar la expresión cuantitativa de GUS como se ha descrito anteriormente. Se ensayaron plantas completas para determinar la inducción de la expresión de GUS con tensión por frío en la etapa V3. Veinte plantas de maíz en etapa V3, que comprendían 2 plantas de cada uno de 10 acontecimientos de transformación para cada elemento regulador o elemento regulador quimérico, se expusieron a una temperatura de 12 grados Celsius en una cámara de cultivo durante 24 horas. Las plantas en la cámara de cultivo se cultivaron bajo una fluencia de luz blanca de 800 micromoles por metro cuadrado por segundo con un ciclo de luz de diez horas de luz blanca y catorce horas de oscuridad. Después de la exposición al frío, se tomaron muestras de los tejidos de las hojas y las raíces para determinar la exposición cuantitativa a GUS como se ha descrito anteriormente. La tabla 5 a continuación muestra el nivel de expresión de GUS en tejidos seleccionados en plantas F1 transformadas con pMON112215.

Tabla 5. Expresión de GUS F1 en plantas de maíz transgénicas, transformadas con pMON112215.

Etapas	Órgano	Inductor	Media	ET
Semilla hidratada	Embrión	-	22,6	1,54
Semilla hidratada	Endospermo	-	7,48	1,64

(continuación)

Etapas	Órgano	Inductor	Media	ET
3 DAG	Raíz	-	0	0
V3	Raíz principal	Sin tensión	0	0
V3	Cuello de la raíz	-	0	0
V3	Raíz principal	Frío	0	0
V3	Cuello de la raíz	-	0	0
V3	Raíz principal	Des	0	0
V3	Cuello de la raíz	-	nd	nd
V7	Raíz seminal	-	0	0
V7	Cuello de la raíz	-	0	0
VT	Raíz seminal	-	8,26	1,38
3 DAG	Coleóptilo	-	0	0
V3	Hojas	Sin tensión	0	0
V3	Hojas	Frío	0	0
V3	Hojas	Des	6,18	0,3
V7	Hoja - Madura	-	0	0
VT	Entrenudo	-	9,83	3,47
VT	Mazorca	-	7,38	1,78
VT	Antera	-	1060,86	849,27
VT	Polen	-	200,74	101,84
VT	Estigma	-	16,63	9,45
21 DAP	Embrión	-	18,6	2,18
35 DAP	Embrión	-	4,16	1,35
10 DAP	Grano	-	0	0
21 DAP	Endospermo	-	11,14	0
35 DAP	Endospermo	-	3,26	2,27

Las plantas de maíz F1, transformadas con pMON112215 ((P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) + L-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 161)) demostraron altos niveles de expresión en tejido de antera VT. También se observó que la expresión en el polen era mayor que en tejidos distintos de la antera. Se observó que la expresión estaba alrededor de los niveles de fondo en el embrión en desarrollo y el endospermo, estigma VT, raíz seminal VT y entrenudo VT. Usando procedimientos de ensayo más sensibles tales como ELISA de expresión de TIC809, se ha demostrado previamente que el promotor y líder SETit.Rcc3 dirige la expresión de un transgén en tejidos de raíz de maíz transformados forma estable (documento WO 2009/126470).

Ejemplo 3: Análisis de elementos reguladores que dirigen GUS en maíz transgénico

El tejido de la raíz y las hojas del maíz de plántulas de 12 a 13 días se bombardea con vectores de control y expresión de GUS de la planta para determinar la capacidad de los elementos reguladores de la transcripción procedentes de *Setaria italica* para dirigir la expresión de un transgén, GUS.

Los tejidos de plantas de maíz se transformaron con las construcciones de expresión de GUS de plantas, enumeradas en la tabla 6, a continuación. Los elementos reguladores presentados en el ejemplo 1 se clonaron en un vector básico de expresión en planta usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Los vectores de expresión en plantas resultantes contenían una región del extremo derecho de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete transgénico para probar el elemento regulador o regulador quimérico compuesto por, un elemento regulador o regulador quimérico, unido operativamente a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente a una secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS) que poseía un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091), unido operativamente a la región de terminación 3' del gen de la proteína de transferencia de lípidos del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 1089); un segundo casete de selección del transgén usado para la selección de las células vegetales transformadas que confirió resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el grupo de elementos reguladores de la transcripción de actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098) y una región del extremo izquierdo de *A. tumefaciens*. Los plásmidos resultantes, pMON129227, pMON129228, pMON129229, pMON129230, pMON129231, pMON129232, pMON129233, pMON129234, pMON129235, pMON129236, pMON129237, pMON129238, pMON129239, pMON129240, pMON129241, pMON129242, pMON129243, pMON129244, pMON129245, pMON129246, pMON129247, pMON129248, pMON129249, pMON129250, pMON129251, pMON129252, pMON129253, pMON129254, pMON129255, pMON129256, pMON129257, pMON129258 y pMON129259 se usaron para transformar tejido de plantas de maíz usando bombardeo de partículas.

Tabla 6. Vectores de transformación de plantas binarias, elementos reguladores o reguladores quiméricos, GUS y 3' UTR.

Construcción	Elementos reguladores	3' UTR
pMON129227	P-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43) L-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 125)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129228	P-SETit.Cyp78a-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 44) L-SETit.Cyp78a-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 126)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129229	P-SETit.OMT2.1-1:1:2 (SEQ ID NO: 66) L-SETit.OMT2.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 140)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129230	P-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 67) L-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 142)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129231	P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68) L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129232	P-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 56) L-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 134)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129233	P-SETit.Prx2-1:1:3 (SEQ ID NO: 81) L-SETit.Prx2-1:1:2 (SEQ ID NO: 155)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129234	P-SETit.Srp-1:1:2 (SEQ ID NO: 92) L-SETit.Srp-1:1:1 (SEQ ID NO: 163)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129235	P-SETit.LaDo-1:1:2 (SEQ ID NO: 62) L-SETit.LaDo-1:1:1 (SEQ ID NO: 137)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129236	P-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 27) L-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 109)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129237	P-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 79) L-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 153)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129238	P-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 34) L-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 115)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129239	P-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 54) L-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 132)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129240	P-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 36) L-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 117)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129241	P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129242	P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129243	P-SETit.Prx47-1:1:2 (SEQ ID NO: 84) L-SETit.Prx47-1:1:1 (SEQ ID NO: 157)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129244	P-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 49) L-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 129)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129245	P-SETit.Omt3-1:1:3 (SEQ ID NO: 69) L-SETit.Omt3-1:1:1 (SEQ ID NO: 143)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129246	P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129247	P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129248	P-SETit.Ucc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 105) L-SETit.Ucc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 170)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129249	P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129250	P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85) L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129251	P-SETit.Prx17-1:1:2 (SEQ ID NO: 80) L-SETit.Prx17-1:1:1 (SEQ ID NO: 154)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129252	P-SETit.Mt1-1:1:2 (SEQ ID NO: 63) L-SETit.Mt1-1:1:1 (SEQ ID NO: 138)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129253	P-SETit.Ali1-1:1:3 (SEQ ID NO: 31) L-SETit.Ali1-1:1:1 (SEQ ID NO: 112)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129254	P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129255	P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72) L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129256	P-SETit.Tga6-1:1:2 (SEQ ID NO: 95)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129257	P-SETit.25509-1:1:3 (SEQ ID NO: 23)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129258	P-SETit.Gr1-1:1:2 (SEQ ID NO: 57)	T-Os.LTP-1:1:1

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	3' UTR
pMON129259	P-SETit.Omt4_2-1:1:2 (SEQ ID NO: 70) L-SETit.Omt4_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 144)	T-Os.LTP-1:1:1

El vector de transformación de plantas, pMON129227 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 125). El vector de transformación de plantas, pMON129228 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cyp78a-1:1:2 (SEQ ID NO: 44), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cyp78a-1:1:1 (SEQ ID NO: 126). El vector de transformación de plantas, pMON129229 comprende el elemento promotor, P-SETit.OMT2.1-1:1:2 (SEQ ID NO: 66), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.OMT2.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 140). El vector de transformación de plantas, pMON129230 comprende el elemento promotor, P-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 67), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 142). El vector de transformación de plantas, pMON129231 comprende el elemento promotor, P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141). El vector de transformación de plantas, pMON129232 comprende el elemento promotor, P-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 56), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 134). El vector de transformación de plantas, pMON129233 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx2-1:1:3 (SEQ ID NO: 81), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx2-1:1:2 (SEQ ID NO: 155). El vector de transformación de plantas, pMON129234 comprende el elemento promotor, P-SETit. Srp-1:1:2 (SEQ ID NO: 92), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Srp-1:1:1 (SEQ ID NO: 163). El vector de transformación de plantas, pMON129235 comprende el elemento promotor, P-SETit.LaDo-1:1:2 (SEQ ID NO: 62), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.LaDo-1:1:1 (SEQ ID NO: 137). El vector de transformación de plantas, pMON129236 comprende el elemento promotor, P-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 27), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 109). El vector de transformación de plantas, pMON129237 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 79), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 153). El vector de transformación de plantas, pMON129238 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 34), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 115). El vector de transformación de plantas, pMON129239 comprende el elemento promotor, P-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 54), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 132). El vector de transformación de plantas, pMON129240 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 36), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 117). El vector de transformación de plantas, pMON129241 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156). El vector de transformación de plantas, pMON129242 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156). El vector de transformación de plantas, pMON129243 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx47-1:1:2 (SEQ ID NO: 84), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx47-1:1:1 (SEQ ID NO: 157). El vector de transformación de plantas, pMON129244 comprende el elemento promotor, P-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 49), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 129). El vector de transformación de plantas, pMON129245 comprende el elemento promotor, P-SETit.Omt3-1:1:3 (SEQ ID NO: 69), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Omt3-1:1:1 (SEQ ID NO: 143). El vector de transformación de plantas, pMON129246 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127). El vector de transformación de plantas, pMON129247 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127). El vector de transformación de plantas, pMON129248 comprende el elemento promotor, P-SETit.Ucc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 105), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ucc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 170). El vector de transformación de plantas, pMON129249 comprende el elemento promotor, P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165). El vector de transformación de plantas, pMON129250 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158). El vector de transformación de plantas, pMON129251 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx17-1:1:2 (SEQ ID NO: 80), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx17-1:1:1 (SEQ ID NO: 154). El vector de transformación de plantas, pMON129252 comprende el elemento promotor, P-SETit.Mt1-1:1:2 (SEQ ID NO: 63), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Mt1-1:1:1 (SEQ ID NO: 138). El vector de transformación de plantas, pMON129253 comprende el elemento promotor, P-SETit.Ali1-1:1:3 (SEQ ID NO: 31), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ali1-1:1:1 (SEQ ID NO: 112). El vector de transformación de plantas, pMON129254 comprende el elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON129255 comprende el elemento promotor, P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146). El vector de transformación de plantas, pMON129256 comprende el elemento promotor, P-SETit.Tga6-1:1:2 (SEQ ID NO: 95). El vector de transformación de plantas, pMON129257 comprende el elemento promotor, P-SETit.25509-1:1:3 (SEQ ID NO: 23). El vector de transformación de plantas, pMON129258 comprende el elemento promotor, P-SETit.Gr1-1:1:2 (SEQ ID NO: 57). El vector de transformación de plantas, pMON129259 comprende el elemento promotor, P-SETit.Omt4_2-1:1:2 (SEQ ID NO: 70), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Omt4_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 144).

Los tejidos de plantas de maíz se transformaron con construcciones de expresión de GUS de plantas, pMON129227,

pMON129228, pMON129229, pMON129230, pMON129231, pMON129232, pMON129233, pMON129234, pMON129235, pMON129236, pMON129237, pMON129238, pMON129239, pMON129240, pMON129241, pMON129242, pMON129243, pMON129244, pMON129245, pMON129246, pMON129247, pMON129248, pMON129249, pMON129250, pMON129251, pMON129252, pMON129253, pMON129254, pMON129255, pMON129256, pMON129257, pMON129258 y pMON129259, usando bombardeo de partículas.

El tejido de la planta de maíz se transformó usando procedimientos de bombardeo de partículas conocidos por los expertos en la materia con los vectores descritos anteriormente. En resumen, las semillas de maíz LH244 se esterilizan en superficie y se permite que germinen en bandejas con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Después de 12 a 13 días, el tejido se recoge en condiciones estériles de las plántulas y se usa para bombardeo. Se usan aproximadamente 10 explantes de hojas y 15 de raíz para el bombardeo de cada construcción experimental. Las muestras de tejido se colocan al azar en una placa de Petri que contiene medio de cultivo de plantas. Se usan diez microgramos de ADN plasmídico para recubrir partículas de oro de 0,6 micrómetros (Catálogo n.º 165-2262 Bio-Rad, Hercules, CA) para bombardeo. Los macrovehículos se cargaron con las partículas de oro recubiertas con ADN (Catálogo n.º 165-2335 Bio-Rad, Hercules CA). Se usó una pistola de biolística PDS 1000/He para transformación (Catálogo n.º 165-2257 Bio-Rad, Hercules CA). Se permitió que los tejidos de raíces y hojas bombardeados se incubaran en oscuridad durante 24 horas a 26 grados Celsius. Tras esta incubación de una noche, los tejidos se tiñen en solución para determinar la expresión de GUS durante una noche a 37 grados Celsius. Después de tinción durante una noche, los tejidos se empaparon en etanol al 70 % durante una noche para retirar clorofila y revelar la tinción de GUS. A continuación, se fotografiaron los tejidos y se asignó a cada construcción una escala de calificación de "0" a "4" que refleja el nivel de expresión de GUS.

También se usaron cuatro plásmidos de control para el bombardeo designados, pMON19469, pMON59327, pMON30098 y pMON103758. Los vectores plasmídicos, pMON19469, pMON59327 y pMON103758 contenían elementos reguladores de la transcripción conocidos que dirigen la expresión de GUS y se usaron como comparadores para la expresión. El vector plasmídico, pMON30098 comprendía un casete transgénico usado para la expresión de proteína verde fluorescente y actuó como control negativo en el ensayo de bombardeo. El vector plasmídico, pMON19469 comprende un casete transgénico que comprende el promotor P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), procedente del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, unido operativamente en 5' a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente a una secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS-3, SEQ ID NO: 1092), unido operativamente en 5' a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). El vector plasmídico, pMON59327 comprende un casete transgénico usado para la expresión de GUS que comprende el promotor Rcc3 del arroz (P-Os.Rcc3-1:1:24, SEQ ID NO: 1093) y líder (L-Os.Rcc3-1:1:1, SEQ ID NO: 1094), unido operativamente en 5' a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS-3, SEQ ID NO: 1092), unido operativamente en 5' a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). El vector plasmídico, pMON103758 comprende un casete transgénico usado para la expresión de GUS que comprende el promotor Rcc3 del arroz (P-Os.Rcc3-1:1:24, SEQ ID NO: 1093) y líder (L-Os.Rcc3-1:1:1, SEQ ID NO: 1094), unido operativamente en 5' a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS-3, SEQ ID NO: 1092), unido operativamente en 5' a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). El vector plasmídico, pMON30098 comprendía un casete transgénico de proteína verde fluorescente y actuó como control negativo en el ensayo de bombardeo y comprendía un casete transgénico que comprendía el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh (SEQ ID NO: 1095) que además comprendía el promotor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-CaMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 1097), unido operativamente en 5' a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de GFP (CR-Av.GFP.nno, SEQ ID NO: 1103), unido operativamente en 5' a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088).

Las calificaciones de expresión promedio de GUS del ensayo de bombardeo de partículas se muestran en la tabla 7 a continuación.

Tabla 7. Clasificaciones de expresión promedio de GUS para la raíz de maíz bombardeada y el tejido de hoja transformado con las construcciones de expresión de GUS de plantas enumeradas.

Construcción	Elementos reguladores	Raíz	Hojas
pMON19469	Promotor P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096)	4	4
pMON59327	P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO: 1093) L-Os.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 1094)	4	0
pMON30098 (control negativo)	EXP-CaMV.35S-enh (SEQ ID NO: 1095)	0	0
pMON103758	P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO: 1093) L-Os.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 1094)	3	0

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Raíz	Hojas
pMON129227	P-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43) L-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 125)	0	0
pMON129228	P-SETit.Cyp78a-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 44) L-SETit.Cyp78a-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 126)	1	0
pMON129229	P-SETit.OMT2.1-1:1:2 (SEQ ID NO: 66) L-SETit.OMT2.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 140)	1	0
pMON129230	P-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 67) L-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 142)	2	0
pMON129231	P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68) L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141)	3	0
pMON129232	P-SETit.Grcw2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 56) L-SETit.Grcw2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 134)	2	0
pMON129233	P-SETit.Prx2-1-1:1:3 (SEQ ID NO: 81) L-SETit.Prx2-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 155)	1	0
pMON129234	P-SETit.Srp-1-1:2 (SEQ ID NO: 92) L-SETit.Srp-1-1:1 (SEQ ID NO: 163)	3	0
pMON129235	P-SETit.LaDo-1-1:2 (SEQ ID NO: 62) L-SETit.LaDo-1-1:1 (SEQ ID NO: 137)	1	0
pMON129236	P-SETit.Aip-1-1:1 (SEQ ID NO: 27) L-SETit.Aip-1-1:1 (SEQ ID NO: 109)	2	0
pMON129237	P-SETit.Prx-1-1:1 (SEQ ID NO: 79) L-SETit.Prx-1-1:1 (SEQ ID NO: 153)	3	1
pMON129238	P-SETit.Cbl7-1-1:1 (SEQ ID NO: 34) L-SETit.Cbl7-1-1:1 (SEQ ID NO: 115)	0	0
pMON129239	P-SETit.Fst-1-1:1 (SEQ ID NO: 54) L-SETit.Fst-1-1:1 (SEQ ID NO: 132)	0	0
pMON129240	P-SETit.Cda-1-1:1 (SEQ ID NO: 36) L-SETit.Cda-1-1:1 (SEQ ID NO: 117)	0	0
pMON129241	P-SETit.Prx3-1-1:4 (SEQ ID NO: 83) L-SETit.Prx3-1-1:1 (SEQ ID NO: 156)	3	2
pMON129242	P-SETit.Prx3-1-1:3 (SEQ ID NO: 82) L-SETit.Prx3-1-1:1 (SEQ ID NO: 156)	3	1
pMON129243	P-SETit.Prx47-1-1:2 (SEQ ID NO: 84) L-SETit.Prx47-1-1:1 (SEQ ID NO: 157)	3	0
pMON129244	P-SETit.Eie-1-1:1 (SEQ ID NO: 49) L-SETit.Eie-1-1:1 (SEQ ID NO: 129)	1	0
pMON129245	P-SETit.Omt3-1-1:3 (SEQ ID NO: 69) L-SETit.Omt3-1-1:1 (SEQ ID NO: 143)	0	0
pMON129246	P-SETit.Cys-1-1:2 (SEQ ID NO: 45) L-SETit.Cys-1-1:1 (SEQ ID NO: 127)	2	0
pMON129247	P-SETit.Cys-1-1:3 (SEQ ID NO: 46) L-SETit.Cys-1-1:1 (SEQ ID NO: 127)	3	0
pMON129248	P-SETit.Ucc1-1-1:2 (SEQ ID NO: 105) L-SETit.Ucc1-1-1:1 (SEQ ID NO: 170)	3	1
pMON129249	P-SETit.Tip-1-1:4 (SEQ ID NO: 97) L-SETit.Tip-1-1:1 (SEQ ID NO: 165)	3	1
pMON129250	P-SETit.Prx72-1-1:2 (SEQ ID NO: 85) L-SETit.Prx72-1-1:1 (SEQ ID NO: 158)	3	2
pMON129251	P-SETit.Prx17-1-1:2 (SEQ ID NO: 80) L-SETit.Prx17-1-1:1 (SEQ ID NO: 154)	0	0
pMON129252	P-SETit.Mt1-1-1:2 (SEQ ID NO: 63) L-SETit.Mt1-1-1:1 (SEQ ID NO: 138)	2	0
pMON129253	P-SETit.Ali1-1-1:3 (SEQ ID NO: 31) L-SETit.Ali1-1-1:1 (SEQ ID NO: 112)	2	0
pMON129254	P-SETit.Rcc3-1-1:16 (SEQ ID NO: 91) L-SETit.Rcc3-1-1:2 (SEQ ID NO: 162)	3	1
pMON129255	P-SETit.Pip2-3-1-1:1 (SEQ ID NO: 72) L-SETit.Pip2-3-1-1:1 (SEQ ID NO: 146)	3	0
pMON129256	P-SETit.Tga6-1-1:2 (SEQ ID NO: 95)	0	0
pMON129257	P-SETit.25509-1-1-3 (SEQ ID NO: 23)	0	0
pMON129258	P-SETit.Grf-1-1:2 (SEQ ID NO: 57)	0	0
pMON129259	P-SETit.Omt4_2-1-1:2 (SEQ ID NO: 70) L-SETit.Omt4_2-1-1:1 (SEQ ID NO: 144)	0	0

El nivel promedio más alto de expresión de GUS para los tejidos de la raíz transformados por bombardeo de partículas se observó usando las construcciones, pMON129231 ((P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68) + L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141)); pMON129234 ((P-SETit.Srp-1:1:2 (SEQ ID NO: 92) + L-SETit.Srp-1:1:1 (SEQ ID NO: 163)); pMON129237 ((P-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 79) + L-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 153)); pMON129241 ((P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) + L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)); pMON129242 ((P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82) + L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)); pMON129243 ((P-SETit.Prx47-1:1:2 (SEQ ID NO: 84) + L-SETit.Prx47-1:1:1 (SEQ ID NO: 157)); pMON129247 ((P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46) + L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)); pMON129248 ((P-SETit.Ucc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 105) + L-SETit.Ucc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 170)); pMON129249 ((P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) + L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165)); pMON129250 ((P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85) + L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158)); pMON129254 ((P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91) + L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)) y pMON129255 ((P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72) + L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146)). Se observó la expresión foliar más alta en tejidos bombardeados con las construcciones pMON129241 ((P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) + L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)) y pMON129250 ((P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85) + L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158)).

Ejemplo 4: Análisis de elementos reguladores que dirigen GUS en maíz transgénico

Se transformaron plantas de maíz con vectores de expresión en plantas que contenían los elementos reguladores de prueba que dirigían la expresión del transgén de la β -glucuronidasa (GUS) y las plantas resultantes se analizaron para determinar la expresión de la proteína GUS.

Las plantas de maíz se transformaron con las construcciones de expresión de GUS de plantas, enumeradas en la tabla 8, a continuación. Los elementos reguladores presentados en el ejemplo 1 para expresión en monocotiledóneas se clonaron en un vector básico de expresión en planta usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Los vectores de expresión en plantas resultantes contenían una región del extremo derecho de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete transgénico para probar el elemento regulador o regulador quimérico compuesto por, un elemento regulador o regulador quimérico, unido operativamente a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente a una secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS) que poseía un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091), unido operativamente a la región de terminación 3' del gen de la proteína de transferencia de lípidos del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 1089); un segundo casete de selección transgénico usado para la selección de las células vegetales transformadas que confirió resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el promotor de actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098) y una región del extremo izquierdo de *A. tumefaciens*. Los plásmidos resultantes, pMON129227, pMON129228, pMON129229, pMON129230, pMON129231, pMON129232, pMON129233, pMON129234, pMON129235, pMON129236, pMON129237, pMON129238, pMON129239, pMON129240, pMON129241, pMON129242, pMON129243, pMON129244, pMON129245, pMON129246, pMON129247, pMON129249, pMON129250, pMON129251, pMON129252, pMON129253, pMON129254, pMON129255, pMON129256, pMON129257, pMON129258 y pMON129259 se usaron para transformar plantas de maíz.

Tabla 8. Vectores de transformación de plantas binarias, elementos reguladores o reguladores quiméricos, GUS y 3' UTR.

Construcción	Elementos reguladores	3' UTR
pMON129227	P-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43) L-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 125)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129228	P-SETit.Cyp78a-1:1:2 (SEQ ID NO: 44) L-SETit.Cyp78a-1:1:1 (SEQ ID NO: 126)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129229	P-SETit.OMT2.1-1:1:2 (SEQ ID NO: 66) L-SETit.OMT2.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 140)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129230	P-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 67) L-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 142)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129231	P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68) L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129232	P-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 56) L-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 134)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129233	P-SETit.Prx2-1:1:3 (SEQ ID NO: 81) L-SETit.Prx2-1:1:2 (SEQ ID NO: 155)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129234	P-SETit.Srp-1:1:2 (SEQ ID NO: 92) L-SETit.Srp-1:1:1 (SEQ ID NO: 163)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129235	P-SETit.LaDo-1:1:2 (SEQ ID NO: 62) L-SETit.LaDo-1:1:1 (SEQ ID NO: 137)	T-Os.LTP-1:1:1

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	3' UTR
pMON129236	P-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 27) L-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 109)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129237	P-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 79) L-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 153)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129238	P-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 34) L-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 115)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129239	P-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 54) L-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 132)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129240	P-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 36) L-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 117)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129241	P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129242	P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129243	P-SETit.Prx47-1:1:2 (SEQ ID NO: 84) L-SETit.Prx47-1:1:1 (SEQ ID NO: 157)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129244	P-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 49) L-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 129)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129245	P-SETit.Omt3-1:1:3 (SEQ ID NO: 69) L-SETit.Omt3-1:1:1 (SEQ ID NO: 143)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129246	P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129247	P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129249	P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129250	P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85) L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129251	P-SETit.Prx17-1:1:2 (SEQ ID NO: 80) L-SETit.Prx17-1:1:1 (SEQ ID NO: 154)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129252	P-SETit.Mt1-1:1:2 (SEQ ID NO: 63) L-SETit.Mt1-1:1:1 (SEQ ID NO: 138)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129253	P-SETit.Ali1-1:1:3 (SEQ ID NO: 31) L-SETit.Ali1-1:1:1 (SEQ ID NO: 112)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129254	P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129255	P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72) L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129256	P-SETit.Tga6-1:1:2 (SEQ ID NO: 95)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129257	P-SETit.25509-1:1:3 (SEQ ID NO: 23)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129258	P-SETit.Grf-1:1:2 (SEQ ID NO: 57)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129259	P-SETit.Omt4 2-1:1:2 (SEQ ID NO: 70) L-SETit.Omt4 2-1:1:1 (SEQ ID NO: 144)	T-Os.LTP-1:1:1

El vector de transformación de plantas, pMON129227 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 125). El vector de transformación de plantas, pMON129228 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cyp78a-1:1:2 (SEQ ID NO: 44), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cyp78a-1:1:1 (SEQ ID NO: 126). El vector de transformación de plantas, pMON129229 comprende el elemento promotor, P-SETit.OMT2.1-1:1:2 (SEQ ID NO: 66), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.OMT2.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 140). El vector de transformación de plantas, pMON129230 comprende el elemento promotor, P-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 67), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 142). El vector de transformación de plantas, pMON 129231 comprende el elemento promotor, P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141). El vector de transformación de plantas, pMON129232 comprende el elemento promotor, P-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 56), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 134). El vector de transformación de plantas, pMON129233 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx2-1:1:3 (SEQ ID NO: 81), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx2-1:1:2 (SEQ ID NO: 155). El vector de transformación de plantas, pMON129234 comprende el elemento promotor, P-SETit.Srp-1:1:2 (SEQ ID NO: 92), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Srp-1:1:1 (SEQ ID NO: 163). El vector de transformación de plantas, pMON129235 comprende el elemento promotor, P-SETit.LaDo-1:1:2 (SEQ ID NO: 62), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.LaDo-1:1:1 (SEQ ID NO: 137). El vector de transformación de plantas, pMON129236 comprende el elemento promotor, P-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 27), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 109). El vector de transformación de plantas, pMON129237 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID

NO: 79), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 153). El vector de transformación de plantas, pMON129238 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 34), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 115). El vector de transformación de plantas, pMON129239 comprende el elemento promotor, P-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 54), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 132). El vector de transformación de plantas, pMON129240 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 36), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 117). El vector de transformación de plantas, pMON129241 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156). El vector de transformación de plantas, pMON129242 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156). El vector de transformación de plantas, pMON129243 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx47-1:1:2 (SEQ ID NO: 84), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx47-1:1:1 (SEQ ID NO: 157). El vector de transformación de plantas, pMON129244 comprende el elemento promotor, P-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 49), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 129). El vector de transformación de plantas, pMON129245 comprende el elemento promotor, P-SETit.Omt3-1:1:3 (SEQ ID NO: 69), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Omt3-1:1:1 (SEQ ID NO: 143). El vector de transformación de plantas, pMON129246 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127). El vector de transformación de plantas, pMON129247 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127). El vector de transformación de plantas, pMON129249 comprende el elemento promotor, P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165). El vector de transformación de plantas, pMON129250 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158). El vector de transformación de plantas, pMON129251 comprende el elemento promotor, P-SETit.Prx17-1:1:2 (SEQ ID NO: 80), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx17-1:1:1 (SEQ ID NO: 154). El vector de transformación de plantas, pMON129252 comprende el elemento promotor, P-SETit.Mt1-1:1:2 (SEQ ID NO: 63), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Mt1-1:1:1 (SEQ ID NO: 138). El vector de transformación de plantas, pMON129253 comprende el elemento promotor, P-SETit.Ali1-1:1:3 (SEQ ID NO: 31), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ali1-1:1:1 (SEQ ID NO: 112). El vector de transformación de plantas, pMON129254 comprende el elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON129255 comprende el elemento promotor, P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146). El vector de transformación de plantas, pMON129256 comprende el elemento promotor, P-SETit.Tga6-1:1:2 (SEQ ID NO: 95). El vector de transformación de plantas, pMON129257 comprende el elemento promotor, P-SETit.25509-1:1:3 (SEQ ID NO: 23). El vector de transformación de plantas, pMON129258 comprende el elemento promotor, P-SETit.Grf-1:1:2 (SEQ ID NO: 57). El vector de transformación de plantas, pMON129259 comprende el elemento promotor, P-SETit.Omt4_2-1:1:2 (SEQ ID NO: 70), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Omt4_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 144).

Las plantas de maíz se transformaron con construcciones de expresión de GUS de plantas, pMON129227, pMON129228, pMON129229, pMON129230, pMON129231, pMON129232, pMON129233, pMON129234, pMON129235, pMON129236, pMON129237, pMON129238, pMON129239, pMON129240, pMON129241, pMON129242, pMON129243, pMON129244, pMON129245, pMON129246, pMON129247, pMON129249, pMON129250, pMON129251, pMON129252, pMON129253, pMON129254, pMON129255, pMON129256, pMON129257, pMON129258 y pMON129259.

Las plantas se transformaron usando transformaciones mediadas por *Agrobacterium* y embriones de semillas de maíz LH244 como se ha descrito en el ejemplo 2. Se recogieron tejidos de hojas y raíces de 1 a 5 transformantes y se ensayaron para determinar la expresión de GUS. Se usó el análisis histoquímico de GUS para el análisis de expresión cualitativa de plantas transformadas. Se incubaron secciones tisulares completas con solución de tinción de GUS X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-glucurónido) (1 miligramo/mililitro) durante un periodo de tiempo adecuado, se enjuagaron y se inspeccionaron visualmente para determinar la coloración azul. La actividad GUS se determinó cualitativamente mediante inspección visual directa o inspección bajo un microscopio usando órganos y tejidos de plantas seleccionadas. Se inspeccionan las plantas R0 para determinar la expresión en las raíces y hojas.

Para el análisis cuantitativo, se extrajo la proteína total de tejidos seleccionados de plantas de maíz transformadas. Se usó un microgramo de proteína total con el sustrato fluorógeno 4-metileumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) en un volumen de reacción total de 50 microlitros. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), tiene fluorescencia máxima a pH elevado, cuando el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de una solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente. La fluorescencia se midió con excitación a 365 nm, emisión a 445 nm usando un Fluoromax-3 con Micromax Reader, con una anchura de rendija configurada para una excitación de 2 nm y una emisión de 3 nm.

La expresión promedio de GUS Ro para plantas transgénicas transformadas con las construcciones descritas en la tabla 8 se muestra en la tabla 9 a continuación.

Tabla 9. Expresión promedio en hojas y raíces V3 de GUS R0 en plantas de maíz transgénicas, transformadas con las construcciones enumeradas.

Construcción	Elementos reguladores	Raíz V3	Hoja V3
pMON129227	P-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43) L-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 125)	0,00	0,00
pMON129228	P-SETit.Cyp78a-1:1:2 (SEQ ID NO: 44) L-SETit.Cyp78a-1:1:1 (SEQ ID NO: 126)	7,91	0,00
pMON129229	P-SETit.OMT2.1-1:1:2 (SEQ ID NO: 66) L-SETit.OMT2.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 140)	0,00	0,00
pMON129230	P-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 67) L-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 142)	0,00	0,00
pMON129231	P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68) L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141)	0,00	0,00
pMON129232	P-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 56) L-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 134)	0,00	0,00
pMON129233	P-SETit.Prx2-1:1:3 (SEQ ID NO: 81) L-SETit.Prx2-1:1:2 (SEQ ID NO: 155)	5,96	nd
pMON129234	P-SETit.Srp-1:1:2 (SEQ ID NO: 92) L-SETit.Srp-1:1:1 (SEQ ID NO: 163)	0,00	0,00
pMON129235	P-SETit.LaDo-1:1:2 (SEQ ID NO: 62) L-SETit.LaDo-1:1:1 (SEQ ID NO: 137)	0,00	0,00
pMON129236	P-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 27) L-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 109)	0,00	0,00
pMON129237	P-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 79) L-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 153)	10,66	0,00
pMON129238	P-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 34) L-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 115)	0,00	0,00
pMON129239	P-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 54) L-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 132)	2,86	0,00
pMON129240	P-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 36) L-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 117)	0,00	0,00
pMON129241	P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	7,49	0,00
pMON129242	P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	1,90	0,00
pMON129243	P-SETit.Prx47-1:1:2 (SEQ ID NO: 84) L-SETit.Prx47-1:1:1 (SEQ ID NO: 157)	9,26	0,00
pMON129244	P-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 49) L-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 129)	2,35	0,00
pMON129245	P-SETit.Omt3-1:1:3 (SEQ ID NO: 69) L-SETit.Omt3-1:1:1 (SEQ ID NO: 143)	0,00	0,00
pMON129246	P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	0,00	0,00
pMON129247	P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	0,00	0,00
pMON129249	P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165)	34,79	0,00
pMON129250	P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85) L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158)	0,00	0,00
pMON129251	P-SETit.Prx17-1:1:2 (SEQ ID NO: 80) L-SETit.Prx17-1:1:1 (SEQ ID NO: 154)	0,00	0,00
pMON129252	P-SETit.Mt1-1:1:2 (SEQ ID NO: 63) L-SETit.Mt1-1:1:1 (SEQ ID NO: 138)	0,00	24,92
pMON129253	P-SETit.Ali1-1:1:3 (SEQ ID NO: 31) L-SETit.Ali1-1:1:1 (SEQ ID NO: 112)	0,00	11,58
pMON129254	P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	9,39	0,00
pMON129255	P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72) L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146)	79,81	0,00
pMON129256	P-SETit.Tga6-1:1:2 (SEQ ID NO: 95)	6,91	0,00
pMON129257	P-SETit.25509-1:1:3 (SEQ ID NO: 23)	0,00	0,00
pMON129258	P-SETit.Grf-1:1:2 (SEQ ID NO: 57)	0,00	0,00

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Raíz V3	Hoja V3
pMON129259	P-SETit.Omt4_2-1:1:2 (SEQ ID NO: 70) L-SETit.Omt4_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 144)	0,00	0,00

Los niveles promedio más altos de expresión de GUS en las raíces de plantas en etapa V3 se observaron en plantas transformadas con las construcciones pMON129255 ((P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72) + L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146)) y pMON129249 ((P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) + L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165)).

5 Ejemplo 5: Análisis de elementos reguladores de actina y tubulina que dirigen GUS en protoplastos de maíz

Los protoplastos de la hoja de maíz se transforman con vectores de expresión en plantas que contienen un elemento regulador de la transcripción de prueba o un grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, que dirigen la expresión del transgén de la β -glucuronidasa (GUS), y se comparan con protoplastos de hoja en los que la expresión de GUS está dirigida por promotores constitutivos conocidos.

- 10 Se transforman células protoplásticas de maíz, procedentes de tejido de la hoja usando procedimientos conocidos en la técnica con vectores de expresión de plantas para comparar la expresión de un transgén dirigido por los grupos de elementos de expresión reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19), EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16), EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18), EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9), EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10), EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11), EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17) y EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15) con la de promotores constitutivos conocidos. Cada grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción se clona usando procedimientos conocidos en la técnica en un vector de expresión de plantas mostrado en la tabla 10 a continuación. Los vectores de expresión de plantas resultantes comprenden un casete transgénico que comprende un grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de la β -glucuronidasa (GUS) (GUS-1 o GUS-3, representadas por las SEQ ID NO: 1090 y 1092, respectivamente), que está unido operativamente en 5' a una región de terminación 3' procedente del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088) o el gen Hsp17 de trigo (T-Ta.Hsp17-1:1:1, SEQ ID NO: 1108).

- Los plásmidos de control usados para la comparación se construyen como se ha descrito anteriormente y comprenden grupos de elementos de expresión reguladores de la transcripción constitutivos conocidos. El vector plasmídico de control, pMON19469 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh/I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1104). El vector plasmídico de control, pMON65328 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh/Lhcb1/I-Os.Act1-1:1:9 (SEQ ID NO: 1105). El vector plasmídico de control, pMON25455 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098). El vector plasmídico de control, pMON122605 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 1107). Cada grupo de elementos reguladores de la transcripción del vector de control está unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de la β -glucuronidasa (GUS) (GUS-1 o GUS-3, representadas por las SEQ ID NO: 1090 y 1092, respectivamente), que está unido operativamente en 5' a una región de terminación 3' procedente del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088) o el gen Hsp17 de trigo (T-Ta.Hsp17-1:1:1, SEQ ID NO: 1108). Además, se proporcionan tres controles como controles para la expresión de luciferasa y GUS de fondo, un control sin ADN, un vector vacío que no está diseñado para expresión transgénica y un vector de expresión usado para expresar proteína verde fluorescente (GFP).

Tabla 10. Vectores de expresión de GUS en plantas y grupos de elementos de expresión reguladores de la transcripción correspondientes y promotores, líderes e intrones constituyentes, y 3' UTR usados para la transformación de protoplastos de hojas de maíz.

Construcción	Elementos reguladores	3' UTR
pMON136270	EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19) P-SETit.TubA3-1:1:3 (SEQ ID NO: 101) L-SETit.TubA3-1:1:1 (SEQ ID NO: 168)	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON136272	EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16) P-SETit.TubA2-1-1:1:3 (SEQ ID NO: 99) L-SETit.TubA2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 166) I-SETit.TubA2_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 176)	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON136275	EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18) P-SETit.TubA2-2-1:1:3 (SEQ ID NO: 100) L-SETit.TubA2-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 167)	T-AGRtu.nos-1:1:13

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	3' UTR
pMON136276	EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9) P-SETit.Act8-1:1:5 (SEQ ID NO: 24) L-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 106) I-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 172) L-SETit.Act8-1:1:3 (SEQ ID NO: 107)	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON136277	EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10) P-SETit.Act8-1:1:6 (SEQ ID NO: 25) L-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 106) I-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 172) L-SETit.Act8-1:1:3 (SEQ ID NO: 107)	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON136278	EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11) P-SETit.Act8-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 26) L-SETit.Act8-1:1:4 (SEQ ID NO: 108) I-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 172) L-SETit.Act8-1:1:3 (SEQ ID NO: 107)	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON136279	EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17) P-SETit.TubA2-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 98) L-SETit.TubA2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 166)	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON136280	EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15) P-SETit.TubA2-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 98) L-SETit.TubA2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 166) I-SETit.TubA2_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 176)	T-AGRtu.nos-1:1:13

El vector de transformación de plantas, pMON136270 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.TubA3-1:1:3 (SEQ ID NO: 101), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.TubA3-1:1:1 (SEQ ID NO: 168). El vector de transformación de plantas, pMON136272 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.TubA2-1-1:1:3 (SEQ ID NO: 99), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.TubA2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 166), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.TubA2_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 176). El vector de transformación de plantas, pMON136275 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.TubA2-2-1:1:3 (SEQ ID NO: 100), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.TubA2-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 167). El vector de transformación de plantas, pMON136276 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.Act8-1:1:5 (SEQ ID NO: 24), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 106), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 172), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Act8-1:1:3 (SEQ ID NO: 107). El vector de transformación de plantas, pMON136277 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.Act8-1:1:6 (SEQ ID NO: 25), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 106), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 172), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Act8-1:1:3 (SEQ ID NO: 107). El vector de transformación de plantas, pMON136278 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.Act8-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 26), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Act8-1:1:4 (SEQ ID NO: 108), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 172), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Act8-1:1:3 (SEQ ID NO: 107). El vector de transformación de plantas, pMON136279 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.TubA2-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 98), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.TubA2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 166). El vector de transformación de plantas, pMON136280 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.TubA2-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 98), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.TubA2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 166), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.TubA2_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 176).

Dos plásmidos, para su uso en cotransformación y normalización de datos, también se construyen usando procedimientos conocidos en la materia. Cada plásmido contiene una secuencia codificante de luciferasa específica que está dirigida por un grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción constitutivos. El vector vegetal, pMON19437 comprende un casete transgénico que comprende un promotor constitutivo (EXP-CaMV.35S-enh, SEQ ID NO: 1095), unido operativamente en 5' a un intrón, (1-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) (LUCIFERASA:1:3, SEQ ID NO: 1109), unido operativamente en 5' a una región de terminación 3' desde el gen de la nopalina sintasa de

Agrobacterium tumefaciens (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). El vector vegetal, pMON63934 comprende un casete transgénico que comprende un grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción constitutivos, (EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1, SEQ ID NO: 1106), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de luciferasa de pensamiento de mar (*Renilla reniformis*) (CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1, SEQ ID NO: 1110), unido operativamente en 5' a una región de terminación 3' desde el gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088).

Se transformaron los protoplastos de la hoja de maíz usando un procedimiento de transformación basado en PEG, similar a los conocidos en la técnica. Las células protoplásticas se transforman con una preparación de ADN que comprenden cantidades equimolares de los dos plásmidos de expresión de luciferasa, pMON19437 y pMON63934 y uno de los plásmidos de prueba y se incubaron durante una noche en oscuridad total. Después de la incubación, las células se enjuagan, se resuspenden y se lisan. Se realizan mediciones tanto de GUS como de luciferasa usando alícuotas de cada preparación de lisis. Esencialmente, las células protoplásticas recogidas transformadas se lisan en tampón de lisis pasivo 5X (Promega). Después de permitir la lisis, se colocan alícuotas de la preparación lisada en dos bandejas de pocillos pequeños diferentes. Se usa una bandeja para las mediciones de GUS. Para el análisis cuantitativo de la expresión de GUS, la proteína total se extrae de la preparación de lisis. Se usa un microgramo de proteína total con el sustrato fluorógeno 4-metileumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) en un volumen de reacción total de 50 microlitros. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), tiene fluorescencia máxima a pH elevado, cuando el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de una solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente. La fluorescencia se mide con excitación a 365 nm, emisión a 445 nm usando un Fluoromax-3 con Micromax Reader, con una anchura de rendija configurada para una excitación de 2 nm y una emisión de 3 nm. Los valores de GUS se expresan como pmol de proteína 4-MU por minuto por miligramo de proteína (pmol 4-MU min⁻¹mg⁻¹ de proteína).

La segunda bandeja se usa para realizar un ensayo de luciferasa doble usando el sistema de ensayo indicador de luciferasa doble (Promega, Madison, WI). Todos los reactivos de detección de luciferasa se preparan según lo descrito por el fabricante y los ensayos se realizan siguiendo el protocolo del fabricante (véase, por ejemplo, Promega Notes Magazine, n.º: 57, 1996, p.02). Se añade reactivo de luciferasa de luciérnaga (LARII) a cada muestra y se registra el ensayo de la actividad de luciferasa de luciérnaga. Una vez completado el ensayo de luciferasa de luciérnaga, la luminiscencia de la luciérnaga se interrumpe y la luminiscencia de la luciferasa de *Renilla reniformis* se activa simultáneamente añadiendo reactivo Stop & Glo[™] a la muestra. La medición de la actividad luciferasa de *Renilla reniformis* se registra después de la activación de la luciferasa de *Renilla*. Se realizan una o dos transformaciones para cada grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción y se determinan los valores medios de expresión para cada grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción a partir de varias muestras de cada experimento de transformación. Las mediciones de las muestras se realizan usando cuatro repeticiones de cada transformación de construcción de grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción de prueba o, como alternativa, tres repeticiones de cada construcción de grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción de prueba por uno de los dos experimentos de transformación. Los niveles medios de expresión de GUS y luciferasa se proporcionan en las tablas 11 y 12. Los valores de luciferasa de luciérnaga se proporcionan en la columna marcada con "Fluc" y los valores de luciferasa de *Renilla* se proporcionan como en la columna marcada con "Rluc".

Para comparar la actividad relativa de cada grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, los valores de GUS se expresan como una relación entre la expresión media de GUS y la actividad luciferasa media y se normalizan con respecto a los niveles de expresión observados para los grupos de elementos de expresión reguladores de la transcripción EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098) y EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 1107). La tabla 11 a continuación muestra las relaciones medias GUS/Rluc normalizadas con respecto a EXP-Os.Act1:1:1 y expresión de EXP-Os.TubA-3:1:1 en protoplastos de maíz.

Tabla 11. Factor de expresión media de GUS/Rluc en relación con la expresión de EXP-Os.TubA-3:1:1 en células protoplásticas de hojas de maíz.

Construcción	Grupo de elementos reguladores de la transcripción	Gus/RLuc medio	Gus/Rluc medio normalizado con respecto a EXP-Os.TubA-3:1:1	Gus/Rluc medio normalizado con respecto a EXP-Os.Act1:1:1
pMON19469	EXP-CaMV.35S-enh/l-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102)	2,640	2,718	1,054
pMON65328	EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1/l-Os.Act1-1:1:9 (SEQ ID NO: 1105)	3,213	3,307	1,283
pMON25455	EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098)	2,504	2,578	1,000
pMON122605	EXP-Os. TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 1107)	0,971	1,000	0,388
pMON136270	EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19)	1,909	1,965	0,762

(continuación)

Construcción	Grupo de elementos reguladores de la transcripción	Gus/RLuc medio	Gus/RLuc medio normalizado con respecto a EXP-Os.TubA-3:1:1	Gus/RLuc medio normalizado con respecto a EXP-Os.Act1:1:1
pMON136272	EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16)	0,144	0,148	0,057
pMON136275	EXP-SETit. TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18)	0,001	0,001	0,000
pMON136276	EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9)	0,353	0,364	0,141
pMON136277	EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10)	0,271	0,279	0,108
pMON136278	EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11)	0,005	0,005	0,002
pMON136279	EXP-SETit. TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17)	0,003	0,004	0,001
pMON136280	EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15)	0,155	0,159	0,062

Tabla 12. Factor de expresión media de GUS/Fluc en relación con la expresión de EXP-Os.TubA-3:1:1 en células protoplásticas de hojas de maíz.

Construcción	Grupo de elementos reguladores de la transcripción	Gus/FLuc media	Gus/Fluc normalizada con respecto a EXP-Os.TubA-3:1:1	Gus/Fluc normalizada con respecto a EXP-Os.Act1:1:1
pMON19469	EXP-CaMV.35S-enh/I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102)	21,580	18,072	2,521
pMON65328	EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb 1/1-Os.Act1-1:1:9 (SEQ ID NO: 1105)	29,566	24,759	3,454
pMON25455	EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098)	8,559	7,167	1,000
pMON122605	EXP-Os. TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 1107)	1,194	1,000	0,140
pMON136270	EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19)	2,222	1,861	0,260
pMON136272	EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16)	0,302	0,253	0,035
pMON136275	EXP-SETit. TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18)	0,002	0,002	0,000
pMON136276	EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9)	0,678	0,568	0,079
pMON136277	EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10)	0,550	0,460	0,064
pMON136278	EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11)	0,009	0,008	0,001
pMON136279	EXP-SETit. TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17)	0,004	0,004	0,001
pMON136280	EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15)	0,378	0,317	0,044

Las relaciones normalizadas de GUS/RLuc y GUS/Fluc proporcionadas en las tablas 11 y 12 proporcionan pruebas de que la mayoría de los elementos de expresión son capaces de dirigir la expresión de GUS en protoplastos de hojas de maíz. Las construcciones, pMON136275 (EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18)) y pMON136279 (EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17)) demostraron la menor cantidad de expresión. La construcción, pMON136270 (EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19)) proporcionó el mayor nivel de expresión entre los elementos de prueba en relación con los controles constitutivos.

Ejemplo 6: Análisis de elementos reguladores de actina y tubulina que dirigen GUS en protoplastos de trigo

Los protoplastos de hojas de trigo se transformaron con vectores de expresión de plantas que contenían un grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción de prueba, que dirigen la expresión del transgén de la β -glucuronidasa (GUS), y se comparan con protoplastos de hoja en los que la expresión de GUS está dirigida por promotores constitutivos conocidos.

Se transformaron células protoplásticas de trigo, procedentes de tejido de la hoja usando procedimientos de transformación basados en PEG conocidos en la técnica con vectores de expresión de plantas para comparar la expresión de un transgén dirigido por los grupos de elementos de expresión reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19), EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16), EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18), EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9), EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10), EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11), EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17) y EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15) con la de promotores constitutivos conocidos. Cada grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción se clona usando procedimientos conocidos en la técnica en un vector de expresión de plantas mostrado en la tabla 10 en el ejemplo 5 anterior. Los vectores de expresión de plantas resultantes comprenden un casete transgénico que comprende un grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de la β -glucuronidasa (GUS) (GUS-1 o GUS-3, representadas por las SEQ ID NO: 1090 y 1092, respectivamente), que está unido operativamente en 5' a una región de terminación 3' procedente del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 56) o el gen Hsp17 de trigo (T-Ta.Hsp17-1:1:1, SEQ ID NO: 57).

Las construcciones de vectores plasmídicos de control y las construcciones de plásmidos de control de transformación de luciferasa fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 5. Se realizaron mediciones de la actividad tanto de GUS como de luciferasa como se ha descrito en el ejemplo 5.

Para comparar la actividad relativa de cada grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, Los valores de GUS se expresaron como una relación de GUS con respecto a actividad luciferasa y se normalizaron con respecto a los niveles de expresión observados para el grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 1107). La tabla 13 a continuación muestra las relaciones de GUS/Rluc normalizadas con respecto a la expresión de EXP-Os.TubA-3:1:1 en protoplastos de maíz.

La actividad de GUS y luciferasa se miden como se ha descrito en el ejemplo 2 con ensayos repetidos para determinar el nivel promedio de expresión de GUS y luciferasa en células protoplásticas de trigo. Los valores medios de GUS se comparan con los valores medios de luciferasa y se normalizan con respecto a la expresión observada en células protoplásticas de trigo transformadas con un vector de expresión de GUS en el que GUS es dirigido por el grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 65) para determinar el factor de actividad relativo de la expresión de GUS dirigida por los grupos de elementos de expresión reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19), EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16), EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18), EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9), EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10), EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11), EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17) y EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15).

Los niveles medios de expresión de GUS y luciferasa se proporcionan en la tabla 13. Los valores de luciferasa de *Renilla* se proporcionan en la columna marcada con "Rluc".

Tabla 13. Factor de expresión media de GUS/Rluc en relación con la expresión de EXP-Os.TubA-3:1:1 en células protoplásticas de hojas de maíz.

Construcción	Grupo de elementos reguladores de la transcripción	Gus/Rluc medio	Gus/Rluc normalizada con respecto a EXP-Os.TubA-3:1:1	Gus/Rluc normalizada con respecto a EXP-Os.Act1:1:1
pMON19469	EXP-CaMV.35S-enh/I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102)	12,540	22,423	1,030
pMON65328	EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb 1/I-Os.Act1-1:1:9 (SEQ ID NO: 1105)	16,371	29,274	1,345
pMON25455	EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098)	12,175	21,770	1,000
pMON122605	EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 1107)	0,559	1,000	0,046
pMON136270	EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19)	2,300	4,112	0,189
pMON136272	EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16)	0,933	1,669	0,077
pMON136275	EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18)	0,028	0,051	0,002
pMON136276	EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9)	1,606	2,873	0,132
pMON136277	EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10)	1,281	2,291	0,105
pMON136278	EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11)	0,051	0,091	0,004

(continuación)

Construcción	Grupo de elementos reguladores de la transcripción	Gus/RLuc medio	Gus/RLuc normalizada con respecto a EXP-Os.TubA-3:1:1	Gus/RLuc normalizada con respecto a EXP-Os.Act1:1:1
pMON136279	EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17)	0,037	0,066	0,003
pMON136280	EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15)	1,516	2,710	0,125

El mayor nivel de expresión de GUS en protoplasto de trigo se observó en células transformadas con las construcciones pMON136270 (EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19)); pMON136276 (EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9)); pMON136277 (EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10)) y pMON136280 (EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15)).

Ejemplo 7: Identificación de elementos reguladores de la transcripción usados para la expresión en semillas.

Se pueden identificar elementos reguladores de la transcripción que comprenden promotores, líderes, intrones y 3' UTR útiles para proporcionar la expresión de un transgén en semillas y tejidos reproductivos de plantas basándose en la expresión de marcadores de secuencia expresados (EST) en bibliotecas de ADNc preparadas a partir de ARN mensajero aislado de semilla, flor y otros tejidos obtenidos de panizo (*Setaria italica* (L.) Beauv). Se preparan bibliotecas de ADNc a partir de tejidos aislados de *S. italica* usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia a partir de tejido de flores a los 0, 4, 7, 14, 21 y 31 días después de la polinización (DAP), así como hojas y raíces. Los ADNc resultantes se secuencian usando diversos procedimientos de secuenciación conocidos en la técnica. Los EST resultantes se ensamblan en conglomerados usando software bioinformático tal como clc_ref_assemble_complete versión 2.01.37139 (CLC bio USA, Cambridge, Massachusetts 02142). Se determinó la abundancia de transcritos de cada conglomerado contando el número de lecturas de ADNc para cada conglomerado. La tabla 14 a continuación muestra conjuntos de conglomerados que se han producido usando ADNc de bibliotecas preparadas a partir de tejido de *S. italica* aislado de la hoja, la raíz y la flor a los 0, 4, 7, 14, 21 y 31 días después de la polinización (DAP) que demuestran expresión en ventanas específicas del desarrollo de la semilla en desarrollo y no se observaron o se observaron mínimamente en la hoja y la raíz. Cada conglomerado se anota usando procedimientos de análisis bioinformático tales como BLAST de nucleótidos y proteínas frente a datos públicos y patentados de genes expresados en monocotiledóneas y dicotiledóneas. En muchos casos, no se identificó un homólogo del conglomerado y se indica en la tabla 14 como "Sin homólogo".

Tabla 14. Conglomerados y anotaciones de EST de panizo.

ID de conglomerado	SEQ ID NO:	Anotación
SETIT-28JUL09-CLUS10381_5	925	proteína hipotética SORBIDRAFT_03g000770
SETIT-28JUL09-CLUS101265_2	926	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS6475_-5	927	Posible proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS1019870_1	928	Posible proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS680767_-4	929	Transportador plastidial de ADP-glucosa
SETIT-28 JUL09-CLUS343 678_-3	930	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS7568_3	931	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS771450_2	932	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1164825_1	933	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1406_-46	934	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1165324_1	935	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1140244_1	936	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS153853_-4	937	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS19108_-4	938	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS23464_-6	939	Posible proteína no caracterizada OS = <i>Oryza</i>
SETIT-28JUL09-CLUS1180442_1	940	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS675196_13	941	Proteína de almacenamiento de semillas de tipo zeína (fragmento)
SETIT-28JUL09-CLUS83_2	942	Almidón sintasa unida a gránulos
SETIT-28JUL09-CLUS16759_4	943	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS5145_3	944	Sin homólogo

(continuación)

ID de conglomerado	SEQ ID NO:	Anotación
SETIT-28JUL09-CLUS1193060_1	945	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1187352_1	946	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS733_4	947	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS4206_-30	948	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS4114_2	949	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS674506_2	950	Alelo S de globulina-1
SETIT-28JUL09-CLUS674506_3	951	Proteína de almacenamiento de embriones de tipo vicilina OS = <i>Zea</i>
SETIT-28JUL09-CLUS53110_1	952	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS2505_8	953	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS2888_5	954	Posible proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS2219_3	955	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS12533_-3	956	Nucleósido difosfato cinasa
SETIT-28JUL09-CLUS12533_-6	957	Nucleósido difosfato cinasa
SETIT-28JUL09-CLUS2300_3	958	proteína hipotética SORBIDRAFT_01g043300
SETIT-28JUL09-CLUS696559_1	959	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS681829_1	960	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS680981_1	961	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS2305_6	962	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS685018_1	963	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS12299_7	964	Poliproteína (fragmento); Ubiquitina 5
SETIT-28JUL09-CLUS295335_-4	965	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS206694_6	966	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1102871_1	967	proteína hipotética SORBIDRAFT_03g001990
SETIT-28JUL09-CLUS1104561_1	968	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS2723_-8	969	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS387500_3	970	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS6331_-8	971	proteína hipotética SORBIDRAFT_03g007310
SETIT-28JUL09-CLUS11037231	972	Proteína Os08g0402800
SETIT-28JUL09-CLUS482_-8	973	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1096748_1	974	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1127439_1	975	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS11151801	976	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS11085971	977	Posible hidrolasa OS = <i>Oryza sativa</i> subsp.
SETIT-28JUL09-CLUS96386_-2	978	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS373929_-2	979	proteína hipotética SORBIDRAFT_09g021920
SETIT-28JUL09-CLUS1090880_1	980	Proteína 1a de protección de telómeros
SETIT-28JUL09-CLUS1130991_1	981	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1131180_1	982	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS5112_3	983	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1020178_2	984	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1437_14	985	Proteína rica en prolina específica de anteras APG
SETIT-28JUL09-CLUS4707_5	986	Posible proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS1130710_1	987	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS880479_1	988	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS879579_1	989	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS17065_3	990	Posible proteína no caracterizada OS = <i>Zea mays</i>

SETIT-28JUL09-CLUSI703_5	991	proteína hipotética SORBIDRAFT_01g038035
SETIT-28JUL09-CLUS878855_1	992	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS35651_8	993	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS533810_3	994	Posible proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS888639_1	995	proteína hipotética SORBIDRAFT_08g019910
SETIT-28JUL09-CLUS8608_2	996	Posible proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS48534_2	997	proteína hipotética SORBIDRAFT_04g001090
SETIT-28JUL09-CLUS8620_17	998	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS31891_4	999	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS6173_1	1000	Proteína Os09g0539100
SETIT-28JUL09-CLUS884159_1	1001	proteína hipotética SORBIDRAFT_05g019890
SETIT-28JUL09-CLUS112639_5	1002	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS886862_1	1003	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS52311_2	1004	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS886157_1	1005	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS4920_5	1006	Fosfatidilinositol 4-cinasa OS = <i>Oryza</i>
SETIT-28JUL09-CLUS1697_9	1007	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS18000_5	1008	proteína hipotética SORBIDRAFT_10g022890
SETIT-28JUL09-CLUS10981_4	1009	6-fosfofructocinasa
SETIT-28JUL09-CLUS880709_1	1010	Liasa específica de sitio apurínico de ARN ribosómico
SETIT-28JUL09-CLUS882664_1	1011	Proteína Os10g0374600
SETIT-28JUL09-CLUSI9159_2	1012	proteína hipotética SORBIDRAFT_06g017240
SETIT-28JUL09-CLUS5475_-2	1013	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1194621_1	1014	Alfa caneína 5 de 22 kD OS = <i>Saccharum officinarum</i> ; Proteína de almacenamiento de semillas
SETIT-28JUL09-CLUS675196_9	1015	Proteína de almacenamiento de semillas de tipo zeína (fragmento)
SETIT-28JUL09-CLUS719393_1	1016	Delta caneína de 10 kD; Proteína de almacenamiento de zeína delta
SETIT-28JUL09-CLUS7229361	1017	Delta caneína de 10 kD
SETIT-28JUL09-CLUS722936_-2	1018	Delta caneína de 10 kD
SETIT-28JUL09-CLUS684877_1	1019	Alfa kafirina OS = <i>Sorghum bicolor</i>
SETIT-28JUL09-CLUS675196_-2	1020	Proteína de almacenamiento de semillas de tipo zeína (fragmento); Alfa-coixina
SETIT-28JUL09-CLUS691558_2	1021	Penisetina de 27 kDa
SETIT-28JUL09-CLUS764553_1	1022	Penisetina de 22 kDa OS = <i>Pennisetum americanum</i>
SETIT-28JUL09-CLUS675787_1	1023	Penisetina de 21 kDa OS = <i>Pennisetum americanum</i> ; Alfa-coixina
SETIT-28JUL09-CLUS691558_-3	1024	Penisetina de 27 kDa
SETIT-28JUL09-CLUS675196_11	1025	Penisetina de 22 kDa OS = <i>Pennisetum americanum</i>
SETIT-28JUL09-CLUS722936_-3	1026	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS695757_1	1027	Posible proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS681682_1	1028	Delta-coixina OS = <i>Coix lacryma-jobi</i> PE = 2 SV = 1; Prolamina
SETIT-28JUL09-CLUS675531_1	1029	N-metiltransferasa
SETIT-28JUL09-CLUS674096_1	1030	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS674121_1	1031	Prolamina
SETIT-28JUL09-CLUS675389_2	1032	Sin homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS677324_1	1033	proteína hipotética SORBIDRAFT_01g012345

Un análisis de la expresión de los ADNc para cada conglomerado presentado en la tabla 14 se proporciona en la tabla 15 a continuación. Para tejido floral, se realizaron los siguientes números totales de lecturas de EST; flor 0 DAP, 251341; flor 4 DAP, 39277; flor 7 DAP, 34330; flor 14 DAP, 34920; flor 21 DAP, 42321; flor 31 DAP, 257327. Para tejido foliar y radicular, se realizaron los siguientes números totales de lecturas de EST; hoja, 478570 y raíz, 434180.

5

Tabla 15. Recuento de ADNc expresados correspondientes a conglomerados de EST.

Anotación de conglomerado	DAP0	DAP4	DAP7	DAP14	DAP21	DAP31	Hojas	Raíz	Ventana de expresión y órgano
SETIT-28JUL09-CLUS10381_5	17	331	0	0	0	0	0	0	0-7

ES 2 882 425 T3

SETIT-28JUL09-CLUS101265_2	12	152	87	0	0	0	0	0	0-7
SETIT-28JUL09-CLUS6475_-5	11	143	82	0	0	0	0	0	0-7
SETIT-28JUL09-CLUS1019870_1	14	119	34	0	0	0	0	0	0-7
SETIT-28JUL09-CLUS680767_-4	0	0	0	239	100	16	0	0	14-31
SETIT-28JUL09-CLUS343678_3	0	0	0	491	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS7568_3	0	0	0	486	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS771450_2	0	0	0	481	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS1164825_1	0	0	0	419	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS1406-4_6	0	0	0	324	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS1165324_1	0	0	0	323	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS1140244_1	0	0	0	310	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS153853_-4	0	0	0	304	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS19108_-4	0	0	0	138	115	0	0	0	14-21
SETIT-28JUL09-CLUS23464_-6	0	0	0	132	111	0	0	0	14-21
SETIT-28JUL09-CLUS1180442_1	0	0	0	294	247	0	0	0	14-21
SETIT-28JUL09-CLUS675196_13	0	0	0	169	142	0	0	0	14-21
SETIT-28JUL09-CLUS83_2	0	0	0	111	187	15	0	0	14-31
SETIT-28JUL09-CLUS16759_4	0	0	0	0	525	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS5145_3	0	0	0	0	448	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS1193060_1	0	0	0	0	390	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS1187352_1	0	0	0	0	385	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS733_4	0	0	0	0	356	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS4206_-30	0	0	0	0	352	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS4114_2	0	0	0	0	324	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS674506_2	0	0	0	0	772	12	0	0	21-31
SETIT-28JUL09-CLUS674506_3	0	0	0	0	545	9	0	0	21-31
SETIT-28JUL09-CLUS53110_1	0	0	0	0	0	167	0	9	31
SETIT-28JUL09-CLUS2505_8	0	0	0	0	0	547	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS2888_5	0	0	0	0	0	475	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS2219_3	0	0	0	0	0	369	0	0	31

(continuación)

Anotación de conglomerado	DAP0	DAP4	DAP7	DAP14	DAP21	DAP31	Hojas	Raíz	Ventana de expresión y órgano
SETIT-28JUL09-CLUS12533 -3	0	0	0	0	0	363	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS12533 -6	0	0	0	0	0	311	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS2300 3	0	0	0	0	0	276	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS696559 1	0	0	0	0	0	250	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS681829 1	0	0	0	0	0	246	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS680981 1	0	0	0	0	0	235	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS2305 6	0	0	0	0	0	220	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS685018 1	0	0	0	0	0	217	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS12299 7	0	295	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS295335 -4	0	569	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS206694 6	0	387	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS1102871 1	0	350	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS1104561 1	0	348	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS2723 -8	0	338	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS387500 3	0	330	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS6331 -8	0	323	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS1103723 1	0	302	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS482 -8	0	90	208	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS1096748 1	0	112	129	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS1127439 1	0	110	127	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS1115180 1	0	104	120	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS1108597 1	0	98	113	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS96386 -2	0	96	110	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS373929 -2	0	91	104	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS1090880 1	0	90	104	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS1130991 1	0	0	562	0	0	0	0	0	7
SETIT-28JUL09-CLUS1131180 1	0	0	495	0	0	0	0	0	7
SETIT-28JUL09-CLUS5112 3	0	0	484	0	0	0	0	0	7
SETIT-28JUL09-CLUS1020178 2	0	0	471	0	0	0	0	0	7
SETIT-28JUL09-CLUS1437 14	0	0	461	0	0	0	0	0	7
SETIT-28JUL09-CLUS4707 5	0	0	446	0	0	0	0	0	7

(continuación)

Anotación de conglomerado	DAP0	DAP4	DAP7	DAP14	DAP21	DAP31	Hojas	Raíz	Ventana de expresión y órgano
SETIT-28JUL09-CLUS1130710_1	0	0	427	0	0	0	0	0	7
SETIT-28JUL09-CLUS880479_1	549	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS879579_1	405	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS17065_3	382	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS1703_5	287	0	0	0	0	0	0	8	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS878855_1	280	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS35651_8	225	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS533810_3	203	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS888639_1	198	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS8608_2	196	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS48534_2	175	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS8620_17	172	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS31891_4	171	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS6173_1	159	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS884159_1	155	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS112639_5	149	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS886862_1	144	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS52311_2	138	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS886157_1	136	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS4920_5	133	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS1697_9	132	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS18000_5	129	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS10981_4	129	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS880709_1	129	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS882664_1	128	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS19159_2	128	0	0	0	0	0	0	0	Óvulo y polen
SETIT-28JUL09-CLUS5475_-2	0	0	1721	12386	34684	11782	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS1194621_1	0	0	1386	9267	23798	8799	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS675196_9	0	0	1232	17098	22397	17083	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS719393_1	0	0	1184	13872	15107	13799	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS722936_1	0	0	1184	23792	30815	25296	0	0	Semilla

(continuación)

Anotación de conglomerado	DAP0	DAP4	DAP7	DAP14	DAP21	DAP31	Hojas	Raíz	Ventana de expresión y órgano
SETIT-28JUL09-CLUS722936 -2	0	0	1179	20955	22818	17587	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS684877 1	0	58	1003	5775	18118	5089	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS675196 -2	0	0	955	27322	31248	23018	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS691558 2	0	0	878	18204	29860	18448	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS764553 1	0	0	771	10897	12055	6685	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS675787 1	0	48	547	11309	12229	11428	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS691558 -3	0	0	511	7149	9793	4697	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS675196 11	0	0	478	5648	6182	5752	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS722936 -3	0	0	255	4537	4906	5131	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS695757 1	0	0	240	2803	3438	2313	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS681682 1	0	0	210	5982	6290	5382	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS675531 1	0	58	178	573	346	458	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS674096 1	0	0	114	1648	2816	1837	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS675389 2	0	0	102	6728	7852	7164	0	0	Semilla
SETIT-28JUL09-CLUS677324 1	0	56	65	133	74	59	0	0	Semilla

Como se puede ver en la tabla 15 anterior, muchos de los conglomerados identificados demuestran expresión en ventanas específicas de desarrollo de semillas; a 0 DAP, en el que se infiere que la expresión es tanto en el óvulo como en el polen, o durante la ventana de desarrollo de la semilla de 4 a 31 DAP. Los conglomerados de ADNc identificados se usaron para diseñar cebadores, que se usaron a continuación con bibliotecas GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) construidas siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 5' de la secuencia de ADN genómico correspondiente. En el caso de promotores, líderes e intrones, esta región clonada contenía el regulador transcripcional 5', 5' UTR y, si está presente, secuencia intrónica cadena arriba de la región codificante de proteínas para cada gen de *S. italica*. Usando esta secuencia, se identificaron elementos reguladores por bioinformática dentro de la región 5' para cada gen. Se usó análisis bioinformático para identificar el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y cualquier bidireccionalidad, intrones o secuencia codificante cadena arriba presente en la secuencia. Usando los resultados de este análisis, se definieron elementos reguladores dentro de la secuencia 5' cadena arriba de la secuencia codificante del gen. A continuación, se diseñaron cebadores para amplificar los elementos reguladores. Se amplificó la molécula de ADN correspondiente para cada elemento regulador usando condiciones convencionales de reacción en cadena de la polimerasa con cebadores que contienen sitios de enzimas de restricción únicos y ADN genómico aislado de *S. italica*. Los fragmentos de ADN resultantes se ligaron en un vector de expresión de plantas básico usando digestión con enzimas de restricción convencional de sitios de restricción compatibles y procedimientos de ligamiento de ADN. En algunos casos, la alta identidad de secuencia entre algunos líderes proporcionó el descubrimiento de elementos reguladores de genes homólogos. Los grupos de elementos reguladores de la transcripción, promotores, líderes e intrones resultantes identificados mediante este análisis se presentan en la tabla 16 a continuación:

Tabla 16. Grupos de elementos reguladores de la transcripción (EXP), promotores (P), líderes (L) e intrones (I) identificados usando análisis de expresión.

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
EXP-SETit.CLUS120796-1	12	Conglomerado 120796-1
EXP-SETit.CLUS19108	13	Conglomerado 19108
EXP-SETit.Ubq5	22	Ubiquitina 5

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
P-SETit.Alc1-1: 1:1	28	Alfa-coixina
P-SETit.Alc1-1:1:2	29	Alfa-coixina
P-SETit.Alc2-1:1:2	30	Alfa-coixina
P-SETit. CLUS1164825-1-1:1:1	37	Conglomerado 1164825-1
P-SETit. CLUS1165324-1:1:1	38	Conglomerado 1165324-1
P-SETit. CLUS120796-1-1:1:1	39	Conglomerado 120796-1
P-SETit. CLUS19108-1:1:2	40	Conglomerado 19108
P-SETit. CLUS882664-1-1:1:2	41	Conglomerado 882664-1
P-SETit.Dzs-1:1:4	47	Proteína de almacenamiento de zeína delta
P-SETit.Dzs-1:1:5	48	Proteína de almacenamiento de zeína delta
P-SETit. EST CLUS675389-2-1:1:2	50	Conglomerado 675389-2
P-SETit. FM54-1:1:2	52	Conglomerado 1102871 1
P-SETit. FM63-1:1:2	53	Conglomerado 1019870 1
P-SETit. Pro1-1:1:2	77	Prolamina
P-SETit. Pro2-1:1:3	78	Prolamina
P-SETit. Ssp1-1:1:1	93	Proteína de almacenamiento de semillas
P-SETit. Ssp1-1:1:2	94	Proteína de almacenamiento de semillas
P-SETit. Ubq5-1:1:2	104	Ubiquitina 5
L-SETit. Alc1-1:1:1	110	Alfa-coixina
L-SETit. Alc2-1:1:1	111	Alfa-coixina
L-SETit. CLUS 1164825-1-1:1:1	118	Conglomerado 1164825-1
L-SETit. CLUS120796-1-1:1:1	119	Conglomerado 120796-1
L-SETit. CLUS120796-1-1:1:2	120	Conglomerado 120796-1
L-SETit. CLUS19108-1:1:1	121	Conglomerado 19108
L-SETit. CLUS19108-1:1:2	122	Conglomerado 19108
L-SETit. CLUS882664-1-1:1:1	123	Conglomerado 882664-1
L-SETit. Dzs-1:1:1	128	Proteína de almacenamiento de zeína delta
L-SETit. EST CLUS675389-2-1:1:1	130	Conglomerado 675389-2
L-SETit. Pro1-1:1:1	151	Prolamina
L-SETit. Pro2-1:1:2	152	Prolamina
L-SETit. Ssp1-1:1:1	164	Proteína de almacenamiento de semillas
L-SETit. Ubq5-1:1:1	170	Ubiquitina 5
I-SETit. CLUS120796-1-1:1:1	173	Conglomerado 120796-1
I-SETit. CLUS19108-1:1:1	174	Conglomerado 19108
I-SETit. Ubq5-1:1:2	178	Ubiquitina 5

En algunos casos, no se pudo identificar el sitio de inicio de la transcripción. Los elementos reguladores de la transcripción, P-SETit.FM54-1:1:2 (SEQ ID NO: 52), P-SETit.FM63-1:1:2 (SEQ ID NO: 53) y P-SETit.CCLUS1165324-1:1:1 (SEQ ID NO: 38) pueden comprender además un elemento promotor unido operativamente a un elemento líder o fragmento de un elemento líder.

Ejemplo 8: Análisis de elementos reguladores de semillas que dirigen GUS en tejidos de maíz bombardeados.

El tejido de la semilla, la raíz y las hojas de plantas de maíz se bombardea con vectores de control y expresión de GUS de la planta para determinar la capacidad de los elementos reguladores de la transcripción procedentes de *Setaria italica* para dirigir la expresión de un transgén, GUS.

Los tejidos de plantas de maíz se transformaron con las construcciones de expresión de GUS de plantas usando bombardeo de partículas, enumeradas en la tabla 17, a continuación. Los elementos reguladores presentados en el ejemplo 7 se clonaron en un vector básico de expresión en planta usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Los vectores de expresión en plantas resultantes contenían una región del extremo derecho de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete transgénico para probar el elemento regulador o regulador quimérico compuesto por, un elemento regulador o regulador quimérico, unido operativamente a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente a una secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS) que poseía un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091), unido operativamente a la región de terminación 3' del gen de la proteína de transferencia de lípidos del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 1089); un segundo casete de selección del transgén usado para la selección de las células

vegetales transformadas que confirió resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el grupo de elementos reguladores de la transcripción de actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098) y una región del extremo izquierdo de *A. tumefaciens*. Los plásmidos resultantes, pMON117992, pMON117993, pMON117994, pMON117995, pMON117996, pMON117997, pMON117998, pMON117999, pMON130551, pMON140500, pMON140501, pMON140502, pMON140503, pMON140504, pMON140505, pMON140506, pMON140507 y pMON140508 se usan para transformar tejido de plantas de maíz usando bombardeo de partículas.

Tabla 17. Construcciones de transformación de plantas binarias y elementos reguladores.

Construcción	Elementos reguladores	Conglomerado de referencia
pMON117992	P-SETit. EST CLUS675389-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 50) L-SETit. EST CLUS675389-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 130)	SETIT-28Jul09-CLUS675389_2
pMON117993	P-SETit. Prol-1:1:2 (SEQ ID NO: 77) L-SETit. Pro1-1:1:1 (SEQ ID NO: 151)	SETIT-28Jul09-CLUS674121_1
pMON117994	P-SETit. Pro2-1:1:3 (SEQ ID NO: 78) L-SETit. Pro2-1:1:2 (SEQ ID NO: 152)	SETIT-28Jul09-CLUS681682_1
pMON117995	P-SETit. CLUS882664-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 41) L-SETit. CLUS882664-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 123)	SETIT-28Jul09-CLUS882664_1
pMON117996	EXP-SETit. CLUS19108 (SEQ ID NO: 13) P-SETit. CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 40) L-SETit. CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 122) I-SETit. CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 174) L-SETit. CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 121)	SETIT-28Jul09-CLUS19108_-4
pMON117997	P-SETit. Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 28) L-SETit. Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 110)	SETIT-28Jul09-CLUS675196_-2
pMON117998	P-SETit. Alc2-1:1:2 (SEQ ID NO: 30) L-SETit. Alc2-1:1:1 (SEQ ID NO: 111)	SETIT-28Jul09-CLUS675787_1
pMON117999	P-SETit. Dzs-1:1:4 (SEQ ID NO: 47) L-SETit. Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)	SETIT-28Jul09-CLUS719393_1
pMON130551	P-SETit. Alc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 29) L-SETit. Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 110)	SETIT-28Jul09-CLUS675196_-2
pMON140500	P-SETit. Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48) L-SETit. Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)	SETIT-28Jul09-CLUS719393_1
pMON140501	P-SETit. Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 93) L-SETit. Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164)	SETIT-28Jul09-CLUS1194621_1
pMON140502	P-SETit. Ssp1-1:1:2 (SEQ ID NO: 94) L-SETit. Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164)	SETIT-28Jul09-CLUS1194621_1
pMON140503	EXP-SETit. CLUS120796-1 (SEQ ID NO: 12) P-SETit. CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 39) L-SETit. CLUS120796-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 120) I-SETit. CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 173) L-SETit. CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 119)	SETIT-28Jul09-CLUS2300_3
pMON140504	P-SETit. CLUS1164825-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 37) L-SETit. CLUS1164825-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 118)	SETIT-28Jul09-CLUS1164825_1
pMON140505	EXP-SETit. Ubq5 (SEQ ID NO: 22) P-SETit. Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 104) L-SETit. Ubq5-1:1:1 (SEQ ID NO: 170) I-SETit. Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 178)	SETIT-28Jul09-CLUS12299_7
pMON140506	P-SETit. FM54-1:1:2 (SEQ ID NO: 52)	SETIT-28Jul09-CLUS1102871_1
pMON140507	P-SETit. FM63-1:1:2 (SEQ ID NO: 53)	SETIT-28Jul09-CLUS1019870_1
pMON140508	P-SETit. CLUS1165324-1:1:1 (SEQ ID NO: 38)	SETIT-28Jul09-CLUS1165324_1

El vector de transformación de plantas, pMON117992 comprende el elemento promotor, P-SETit. EST CLUS675389-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 50), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit. EST CLUS675389-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 130). El vector de transformación de plantas, pMON117993 comprende el elemento promotor, P-SETit. Pro1-1:1:2 (SEQ ID NO: 77), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit. Pro1-1:1:1 (SEQ ID NO: 151). El vector de transformación de plantas, pMON117994 comprende el elemento promotor, P-SETit. Pro2-1:1:3 (SEQ ID NO: 78), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit. Pro2-1:1:2 (SEQ ID NO: 152). El vector de transformación de plantas, pMON117995 comprende el elemento promotor, P-SETit. CLUS882664-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 41), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit. CLUS882664-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 123). El vector de transformación de plantas, pMON117996 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit. CLUS19108 (SEQ ID NO: 13), que comprende además el elemento promotor, P-SETit. CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 40), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit. CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 122), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit. CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 174), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit. CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 121). El vector de transformación de plantas, pMON117997 comprende el elemento promotor, P-SETit. Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 28), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit. Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 110). El vector de transformación de plantas, pMON117998

comprende el elemento promotor, P-SETit. Alc2-1:1:2 (SEQ ID NO: 30), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Alc2-1:1:1 (SEQ ID NO: 111). El vector de transformación de plantas, pMON 117999 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cys-1:1:4 (SEQ ID NO: 47), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128). El vector de transformación de plantas, pMON130551 comprende el elemento promotor, P-SETit.Alc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 29), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 110). El vector de transformación de plantas, pMON140500 comprende el elemento promotor, P-SETit.Cys-1:1:5 (SEQ ID NO: 48), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128). El vector de transformación de plantas, pMON140501 comprende el elemento promotor, P-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 93), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164). El vector de transformación de plantas, pMON140502 comprende el elemento promotor, P-SETit.Ssp1-1:1:2 (SEQ ID NO: 94), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164). El vector de transformación de plantas, pMON140503 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.CLUS120796-1 (SEQ ID NO: 12), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 39), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.CLUS120796-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 120), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 173), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 119). El vector de transformación de plantas, pMON140504 comprende el elemento promotor, P-SETit.CLUS1164825-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 37), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.CLUS1164825-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 118). El vector de transformación de plantas, pMON140505 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.Ubq5 (SEQ ID NO: 22), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 104), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ubq5-1:1:1 (SEQ ID NO: 170), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 178). El vector de transformación de plantas, pMON140506 comprende el elemento promotor, P-SETit.FM54-1:1:2 (SEQ ID NO: 52). El vector de transformación de plantas, pMON140507 comprende el elemento promotor, P-SETit.FM63-1:1:2 (SEQ ID NO: 53). El vector de transformación de plantas, pMON 140508 comprende el elemento promotor, P-SETit.CLUS1165324-1:1:1 (SEQ ID NO: 38).

Los tejidos de plantas de maíz se transforman usando procedimientos de bombardeo de partículas y semillas de maíz LH244 como se ha descrito en el ejemplo 3 anterior. Los tejidos de las raíces y las hojas bombardeados se dejan incuban en la oscuridad durante 24 horas a 26 °C. Después de esta incubación durante una noche, los tejidos se tiñen en solución para determinar la expresión de GUS durante una noche a 37 grados Celsius. Después de tinción durante una noche, los tejidos se empapan en etanol al 70 % durante una noche para retirar clorofila y revelar la tinción de GUS. A continuación, se fotografían los tejidos y se asigna a cada construcción una escala de calificación de "0" a "4" que refleja el nivel de expresión de GUS.

La expresión del transgén de GUS demostrada en cada tejido se usa para inferir el nivel potencial relativo y la especificidad de la capacidad de cada elemento para dirigir la expresión del transgén en plantas de maíz transformadas de forma estable. Las calificaciones de expresión promedio de GUS se proporcionan en la tabla 18 a continuación.

Tabla 18. Calificaciones de expresión de GUS para el ensayo de bombardeo de partículas de promotores de semillas potenciales.

Construcción	Elementos reguladores	Embrión	Endospermo	Raíz	Hojas
pMON117992	P-SETit. EST CLUS675389-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 50) L-SETit. EST CLUS675389-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 130)	1	1	1	0
pMON117993	P-SETit.Pro1-1:1:2 (SEQ ID NO: 77) L-SETit.Pro1-1:1:1 (SEQ ID NO: 151)	1	3	1	0
pMON117994	P-SETit.Pro2-1:1:3 (SEQ ID NO: 78) L-SETit.Pro2-1:1:2 (SEQ ID NO: 152)	1	3 J	1	0
pMON117995	P-SETit. CLUS882664-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 41) L-SETit.CLUS882664-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 123)	0	0	1	0
pMON117996	EXP-SETit.CLUS19108 (SEQ ID NO: 13) P-SETit.CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 40) L-SETit.CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 122) I-SETit.CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 174) L-SETit.CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 121)	3	3	2	0
pMON117997	P-SETit.Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 28) L-SETit.Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 110)	1	4	1	0
pMON1 17998	P-SETit.Alc2-1:1:2 (SEQ ID NO: 30) L-SETit.Alc2-1:1:1 (SEQ ID NO: 111)	0	3	1	0
pMON1 17999	P-SETit.Dzs-1:1:4 (SEQ ID NO: 47) L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)	2	3	2	0

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Embrión	Endospermo	Raíz	Hojas
pMON130551	P-SETit.Alc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 29) L-SETit.Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 110)	1	2	1	0
pMON140500	P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48) L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)	0	3	3	0
pMON140501	P-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 93) L-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164)	0	2	1	0
pMON140502	P-SETit.Ssp1-1:1:2 (SEQ ID NO: 94) L-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164)	0	3	1	0
pMON140503	EXP-SETit.CLUS120796-1 (SEQ ID NO: 12) P-SETit.CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 39) L-SETit.CLUS120796-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 120) I-SETit.CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 173) L-SETit.CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 119)	1	0	2	0
pMON140504	P-SETit.CLUS1164825-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 37) L-SETit.CLUS1164825-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 118)	0	0	1	0
pMON140505	EXP-SETit.Ubq5 (SEQ ID NO: 22) P-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 104) L-SETit.Ubq5-1:1:1 (SEQ ID NO: 170) I-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 178)	4	5	4	4
pMON140506	P-SETit.FM54-1:1:2 (SEQ ID NO: 52)	1	0	1	0
pMON140507	P-SETit.FM63-1:1:2 (SEQ ID NO: 53)	1	0	2	0
pMON140508	P-SETit.CLUS1165324-1:1:1 (SEQ ID NO: 38)	0	0	1	0

En todos los casos, se observó algo de expresión transgénica en tejidos bombardeados con la construcción mostrada anteriormente en la tabla 18. Se observaron los niveles más altos de expresión en la semilla para los tejidos bombardeados con las construcciones, pMON117996 ((EXP-SETit.CLUS19108 (SEQ ID NO: 13) que comprende P-SETit.CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 40) + L-SETit.CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 122) + I-SETit.CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 174) + L-SETit.CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 121)) y pMON140505 ((EXP-SETit.Ubq5 (SEQ ID NO: 22) que comprende P-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 104) + L-SETit.Ubq5-1:1:1 (SEQ ID NO: 170) + I-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 178)). Sorprendentemente, la construcción pMON140505 ((EXP-SETit.Ubq5 (SEQ ID NO: 22) que comprendía P-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 104) + L-SETit.Ubq5-1:1:1 (SEQ ID NO: 170) + I-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 178)) demostró altos niveles de expresión constitutiva que no se habían predicho inicialmente por los recuentos de EST proporcionados en la tabla 15 del ejemplo 7. Algunas construcciones, tales como, pMON117998 (P-SETit.Alc2-1:1:2 (SEQ ID NO: 30) + L-SETit.Alc2-1:1:1 (SEQ ID NO: 111)); pMON140500 (P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48) + L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)); pMON140501 (P-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 93) + L-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164) y pMON140502 (P-SETit.Ssp1-1:1:2 (SEQ ID NO: 94) + L-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164)), demostraron expresión en el endospermo y no en el embrión. Además, aunque la construcción, pMON140500 (P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48) + L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)) demostró expresión solo en el endospermo, la construcción, pMON117999 (P-SETit.Dzs-1:1:4 (SEQ ID NO: 47) + L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)), que comprende una versión más larga del promotor Dzs, (P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48)), demostró expresión tanto en el endospermo como en el embrión, lo que sugiere el potencial de un potenciador de embriones que comprende el fragmento suprimido de P-SETit.Dzs-1:1:4 (SEQ ID NO: 47) para producir P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48).

Ejemplo 9: Elementos reguladores que dirigen la expresión del transgén de GUS en maíz o trigo transgénico

Las plantas de maíz o trigo se transforman con construcciones que comprenden elementos reguladores tales como los grupos de elementos reguladores de la transcripción, proporcionados como las SEQ ID NO: 1 a 22; o los promotores proporcionados como las SEQ ID NO: 23 a 105 y las SEQ ID NO: 353 a 536, unidos operativamente a cualquiera de los líderes proporcionados como las SEQ ID NO: 106 a 171 y 537 a 588. Los grupos de elementos reguladores de la transcripción o promotores pueden unirse operativamente a un transgén marcador tal como GUS similar al descrito en el ejemplo 2 anterior. Además, elementos intrónicos tales como los proporcionados como las SEQ ID NO: 172 a 267 y las SEQ ID NO: 317 a 323 y las SEQ ID NO: 589 a 778 se pueden unir operativamente entre los elementos de expresión y el transgén de interés para mejorar la expresión o modular la expresión del transgén dentro de la planta transformada. Las plantas se transforman usando procedimientos de *Agrobacterium* o bombardeo de partículas conocidos en la técnica. Se seleccionan transformantes que contienen una o dos copias del casete transgénico usando procedimientos conocidos en la técnica. A continuación, se ensayan los transformantes para determinar el nivel de expresión del transgén marcador en diversos tejidos de la planta de forma similar a lo descrito en el ejemplo 2. La descendencia F1 se produce cruzando el acontecimiento transformado con un acontecimiento no transformado o mediante autofecundación. Se cultiva la descendencia F1 y se determina la expresión del transgén marcador usando una descendencia que posee una o dos copias del casete transgénico. Se

seleccionan elementos reguladores quiméricos que comprenden cualquiera de los promotores, líder e intrones presentados anteriormente basándose en el nivel de expresión y la especificidad tisular de la expresión para dirigir transgenes de importancia agronómica o comercial.

Ejemplo 10: Potenciadores procedentes de los elementos reguladores

- 5 Los potenciadores proceden de los elementos promotores presentados como las SEQ ID NO: 23 a 105 y las SEQ ID NO: 353 a 536. El elemento potenciador puede comprender uno o más elementos reguladores en *cis* que, cuando se unen operativamente en 5' o 3' a un elemento promotor o se unen operativamente en 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están unidos operativamente a un promotor, pueden mejorar o modular la expresión de un transgén, o proporcionar la expresión de un transgén en un tipo celular u órgano vegetal específico o en un momento particular en el desarrollo o ritmo circadiano. Los potenciadores se producen mediante la eliminación de la
- 10 secuencia TATA o elementos funcionalmente similares y cualquier secuencia cadena abajo de los promotores que permiten que se inicie la transcripción de los promotores presentados como las SEQ ID NO: 23 a 105 y las SEQ ID NO: 353 a 536 o fragmentos de los mismos, en los que se eliminan la secuencia TATA o elementos funcionalmente similares y la secuencia cadena abajo de la secuencia TATA.
- 15 Los elementos potenciadores proceden de los elementos promotores presentados como las SEQ ID NO: 23 a 105 y las SEQ ID NO: 353 a 536 y clonados usando procedimientos conocidos en la técnica para estar unidos operativamente en 5' o 3' a un elemento promotor o unidos operativamente en 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están unidos operativamente a un promotor. Como alternativa, se clonan elementos potenciadores usando procedimientos conocidos en la técnica para estar unidos operativamente a una o más copias del elemento
- 20 potenciador que están unidos operativamente en 5' o 3' a un elemento promotor o unidos operativamente en 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están unidos operativamente a un promotor. Los elementos potenciadores también se pueden clonar usando procedimientos conocidos en la técnica para estar unidos operativamente en 5' o 3' a un elemento promotor procedente de un organismo de género diferente o unidos operativamente en 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales procedentes de organismos de otro género u organismo del mismo género que se unen operativamente a un promotor procedente del organismo del mismo o diferente género, lo que da lugar a un
- 25 elemento regulador quimérico. Un vector de transformación de plantas de expresión de GUS se construye usando procedimientos conocidos en la técnica similares a las construcciones descritas en los ejemplos previos en los que los vectores de expresión de plantas resultantes contienen una región del extremo derecho de *A. tumefaciens*, un primer casete transgénico para probar el elemento regulador o un regulador quimérico compuesto por, un elemento regulador o regulador quimérico, unido operativamente a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays* o cualquiera de los intrones presentados como las SEQ ID NO: 172 a 267 y las SEQ ID NO: 317 a 323 y las SEQ ID NO: 589 a 778 o cualquier otro intrón, unido operativamente a una secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS) que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091) o sin intrón (GUS-1, SEQ ID NO: 1090), unido operativamente a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088) o la región de terminación 3' del gen de la proteína de transferencia de lípidos del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 1089); un segundo casete transgénico de selección usado para la selección de células
- 35 vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el promotor de actina 1 del arroz) o, como alternativa, el antibiótico kanamicina (dirigido por el promotor de actina 1 del arroz) y una región del extremo izquierdo de *A. tumefaciens*. Los plásmidos resultantes se usan para transformar plantas de maíz o plantas de otro género mediante los procedimientos descritos anteriormente o mediante otros procedimientos de bombardeo de partículas o mediados por *Agrobacterium* conocidos en la materia. Como alternativa, las células protoplásticas procedentes de plantas de maíz u otro género se transforman usando procedimientos conocidos en la técnica para realizar ensayos transitorios
- 40 La expresión de GUS dirigida por el elemento regulador de prueba que comprende uno o más potenciadores se evalúa en ensayos de plantas estables o transitorios para determinar los efectos del elemento potenciador sobre la expresión de un transgén. Las modificaciones de uno o más elementos potenciadores o la duplicación de uno o más elementos potenciadores se realizan en función de la experimentación empírica y la regulación de la expresión génica resultante que se observa usando cada composición de elementos reguladores. Alterar las posiciones relativas de uno o más potenciadores en el elemento regulador o regulador quimérico resultante puede alterar la
- 50 actividad o especificidad transcripcional del elemento regulador o regulador quimérico y se determina empíricamente para identificar los mejores potenciadores para el perfil de expresión transgénico deseado dentro de la planta de maíz o planta de otro género.

Ejemplo 11: Análisis de la mejora mediada por intrones de la actividad GUS usando protoplastos procedentes de plantas

- 55 La introducción de un gen extraño en un huésped vegetal nuevo no siempre da lugar a una alta expresión del gen entrante. Asimismo, si se trata de rasgos complejos, en ocasiones es necesario modular varios genes con un patrón de expresión espacial o temporalmente diferente. Los intrones pueden proporcionar principalmente dicha modulación. Sin embargo, se ha mostrado que múltiples usos del mismo intrón en una planta presentan desventajas. En esos casos, es necesario tener una colección de elementos de control básicos para la construcción de elementos de ADN recombinante adecuados. Sin embargo, la colección disponible de intrones con propiedades potenciadoras de la expresión es limitada y se necesitan alternativas.
- 60

En plantas, la inclusión de algunos intrones en construcciones génicas conduce a una mayor acumulación de ARNm y proteínas con respecto a las construcciones que carecen de intrón. Este efecto se ha denominado "mejora mediada por intrones" (IME, de sus siglas en inglés) de la expresión génica (Mascarenhas y col., (1990) Plant Mol. Biol. 15: 913-920). Se han identificado intrones que se sabe que estimulan la expresión en plantas en genes de maíz (p. ej., *tubA1*, *Adh1*, *Sh1*, *Ubi1* (Jeon y col. (2000) Plant Physiol. 123: 1005-1014; Callis y col. (1987) Genes Dev. 1: 1183-1200; Vasil y col. (1989) Plant Physiol. 91: 1575-1579; Christiansen y col. (1992) Plant Mol. Biol. 18: 675-689) y en genes de arroz (p. ej., *salT*, *tpi*: McElroy y col., Plant Cell 2: 163-171 (1990); Xu y col., Plant Physiol. 106: 459-467 (1994)). De manera similar, se ha descubierto que intrones de genes de plantas dicotiledóneas como los de petunia (p. ej. *rbcS*), patata (p. ej., *st-1s1*) y de *Arabidopsis thaliana* (p. ej., *ubq3* y *pat1*) elevan las tasas de expresión génica (Dean y col., (1989) Plant Cell 1: 201-208; Leon y col. (1991) Plant Physiol. 95: 968-972; Norris y col. (1993) Plant Mol Biol 21: 895-906; Rose y Last (1997) Plant J. 11: 455-464). Se ha mostrado que las supresiones o mutaciones en los sitios de corte y empalme de un intrón reducen la expresión génica, lo que indica que podría ser necesario corte y empalme para IME (Mascarenhas y col., (1990) Plant Mol Biol. 15: 913-920; Clancy y Hannah (2002) Plant Physiol. 130: 918-929). Sin embargo, mutaciones puntuales dentro de los sitios de empalme del gen *pat1* de *A. thaliana* han mostrado que el corte y empalme en sí no es necesario para un determinado IME en plantas dicotiledóneas (Rose y Beliakoff (2000) Plant Physiol. 122: 535-542).

La mejora de la expresión génica por intrones no es un fenómeno general porque algunas inserciones de intrones en casetes de expresión recombinantes no mejoran la expresión (p. ej., intrones de genes de dicotiledóneas (gen *rbcS* de guisante, gen de faseolina de judía y el gen *stls-1* de *Solanum tuberosum*) e intrones de genes de maíz (gen *adh1*, el noveno intrón, gen *hsp81*, el primer intrón)) (Chee y col., (1986) Gene 41: 47-57; Kuhlemeier y col. (1988) Mol Gen Genet 212: 405-411; Mascarenhas y col. (1990) Plant Mol. Biol. 15: 913-920; Sinibaldi y Mettler (1992) en WE Cohn, K Moldave, eds, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 42. Academic Press, Nueva York, págs. 229-257; Vancanneyt y col. 1990 Mol. Gen. Genet. 220: 245-250). Por lo tanto, no se puede emplear cada intrón con el fin de manipular el nivel de expresión génica de genes no endógenos o genes endógenos en plantas transgénicas. No se conoce en la técnica anterior qué características o elementos de secuencia específicos deben estar presentes en una secuencia intrónica para mejorar la tasa de expresión de un gen dado y, por lo tanto, a partir de la técnica anterior no es posible predecir si un intrón de planta dado, cuando se usa de forma heteróloga, causará IME

Se selecciona un intrón basándose en la experimentación y la comparación con un control de vector de expresión sin intrones para seleccionar empíricamente un intrón y una configuración dentro de la disposición de elementos de ADN-T del vector para la expresión óptima de un transgén. Por ejemplo, en la expresión de un gen de resistencia a herbicida, tal como CP4, que confiere resistencia al herbicida glifosato, es deseable tener una expresión transgénica dentro de los tejidos reproductivos así como los tejidos vegetativos, para evitar la pérdida de rendimiento cuando se aplica el herbicida. En este caso, un intrón se seleccionaría según su capacidad cuando esté unido operativamente a un promotor constitutivo, para mejorar la expresión del transgén que confiere resistencia a los herbicidas, en particular, dentro de las células y tejidos reproductivos de la planta transgénica y, por tanto, proporcionar tolerancia tanto vegetativa como reproductiva a la planta transgénica, cuando se le pulveriza el herbicida (véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional, WO2007/098042A2).

Los intrones presentados como las SEQ ID NO: 16 a 306 se identifican usando contigs de ADN genómico en comparación con conglomerados de marcadores de secuencia expresados o contigs de ADNc para identificar secuencias exónicas e intrónicas dentro del ADN genómico. Además, las secuencias 5' UTR o líder también se usan para definir la unión de corte y empalme de intrón/exón de uno o más intrones en condiciones en las que la secuencia del gen codifica una secuencia líder que está interrumpida por uno o más intrones. Los intrones presentados como las SEQ ID NO: 172 a 267 y las SEQ ID NO: 317 a 323 y las SEQ ID NO: 589 a 778 se clonan usando procedimientos conocidos en la técnica en un vector de transformación de plantas para unirse operativamente en 3' a un elemento regulador de la transcripción y fragmento líder y unirse operativamente en 5' ya sea a un segundo fragmento líder o a secuencias codificantes representadas en los dos casetes transgénicos presentados en la FIG. 15. Un primer casete de expresión posible (configuración 1 de casete transgénico de expresión en la FIG. 15) comprende un promotor o elemento promotor quimérico [A], unido operativamente en 5' a un elemento líder [B], unido operativamente en 5' a un elemento intrónico de prueba [C], unido operativamente a una región codificante [D], que está unido operativamente a un elemento 3' UTR [E]. Como alternativa, un segundo casete de expresión posible (configuración 2 de casete transgénico de expresión en la figura 15) comprende un promotor o elemento promotor quimérico [F], unido operativamente en 5' a un primer elemento líder o primer fragmento del elemento líder [G], unido operativamente en 5' a un elemento intrónico de prueba [H], unido operativamente en 5' a un segundo elemento líder o primer fragmento del segundo elemento líder [I], unido operativamente a una región codificante [J], que está unido operativamente a un elemento 3' UTR [K].

Los primeros 6 nucleótidos en el extremo 5' y los últimos 6 nucleótidos en el extremo 3' de los intrones presentados como las SEQ ID NO: 172 a 267 y las SEQ ID NO: 317 a 323 y las SEQ ID NO: 589 a 778 representan nucleótidos antes y después de la unión de corte y empalme de intrón/exón, respectivamente. Estas secuencias cortas de 6 nucleótidos se pueden alterar o modificar teniendo una secuencia adicional adjunta (es decir, nativa o artificial) para facilitar la clonación del intrón en un vector de transformación de plantas, siempre que el séptimo y octavo nucleótidos del extremo 5' (GT) y el séptimo y octavo nucleótidos del extremo 3' (AG) de las SEQ ID NO: 172 a 267 y las SEQ ID NO: 317 a 323 y las SEQ ID NO: 589 a 778 se conserven, conservando de este modo la unión de corte y

empalme de intrón/exón del intrón. Es preferible evitar el uso de la secuencia de nucleótidos TG o G justo antes del séptimo y octavo nucleótidos del extremo 5' (GT) y la secuencia de nucleótidos, A o AT del séptimo y octavo nucleótidos del extremo 3' (AG) para eliminar la posibilidad de que se formen codones de inicio y de parada no deseados durante el procesamiento del ARN mensajero en el transcrito final.

5 Los intrones se ensayan para determinar la capacidad de mejorar la expresión en un ensayo transitorio o un ensayo de plantas estable. Para el ensayo transitorio de la mejora mediada por intrones, se construye un vector de planta base usando procedimientos conocidos en la técnica. El intrón se clona en un vector de planta base que comprende un casete de expresión compuesto por un promotor constitutivo tal como el promotor del virus del mosaico de la coliflor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-CaMV.35S-1:1:15 (SEQ ID NO: 1111), unido operativamente en 5' a un elemento intrónico de prueba (SEQ ID NO: 172 a 267 y las SEQ ID NO: 317 a 323 y las SEQ ID NO: 589 a 778), unido operativamente a una secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS) que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091) o sin intrón (GUS-1, SEQ ID NO: 1090), unido operativamente a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRTu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). Se transforman células protoplásticas procedentes de tejido de maíz o planta de otro género con el vector de planta base y se analiza su actividad. Se realiza una comparación de actividad usando un plásmido de control compuesto por el mismo casete de transgén que el plásmido de prueba, pero sin el intrón de prueba para ver si el intrón proporciona un efecto de mejora mediado por intrón.

20 Dos plásmidos, para su uso en cotransformación y normalización de datos, también se construyen usando procedimientos conocidos en la materia. Cada plásmido contiene una secuencia codificante de luciferasa específica que está dirigida por un grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción constitutivos. El vector vegetal, pMON19437 comprende un casete transgénico que comprende un promotor constitutivo (EXP-CaMV.35S-enh, SEQ ID NO: 1095), unido operativamente en 5' a un intrón, (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) (LUCIFERASA:1:3, SEQ ID NO: 1109), unido operativamente en 5' a una región de terminación 3' desde el gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRTu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). El vector vegetal, pMON63934 comprende un casete transgénico que comprende un grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción constitutivos, (EXP-CaMV.35S-enh-Lhcbl, SEQ ID NO: 1106), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de luciferasa de pensamiento de mar (*Renilla reniformis*) (CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1, SEQ ID NO: 1110), unido operativamente en 5' a una región de terminación 3' desde el gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRTu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088).

35 Se transforman protoplastos de hojas de maíz o protoplastos de plantas de otro género usando un procedimiento de transformación basado en PEG, similar a los conocidos en la técnica. Las células protoplásticas se transforman con una preparación de ADN que comprenden cantidades equimolares de los dos plásmidos de expresión de luciferasa, pMON19437 y pMON63934 y uno de los plásmidos de prueba y se incubaron durante una noche en oscuridad total. Después de la incubación, las células se enjuagan, se resuspenden y se lisan. Se realizan mediciones tanto de GUS como de luciferasa usando alícuotas de cada preparación de lisis. Esencialmente, las células protoplásticas recogidas transformadas se lisan en tampón de lisis pasivo 5X (Promega). Después de permitir la lisis, se colocan alícuotas de la preparación lisada en dos bandejas de pocillos pequeños diferentes. Se usa una bandeja para las mediciones de GUS. Para el análisis cuantitativo de la expresión de GUS, la proteína total se extrae de la preparación de lisis. Se usa un microgramo de proteína total con el sustrato fluorógeno 4-metileumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) en un volumen de reacción total de 50 microlitros. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), tiene fluorescencia máxima a pH elevado, cuando el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de una solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente. La fluorescencia se mide con excitación a 365 nm, emisión a 445 nm usando un Fluoromax-3 con 40 Micromax Reader, con una anchura de rendija configurada para una excitación de 2 nm y una emisión de 3 nm. Los valores de GUS se expresan como pmol de proteína 4-MU por minuto por miligramo de proteína (pmol 4-MU min⁻¹mg⁻¹ de proteína).

50 La segunda bandeja se usa para realizar un ensayo de luciferasa doble como se ha descrito en el ejemplo 5 anterior. Para comparar la capacidad relativa del intrón para mejorar la expresión, los valores de GUS se expresan como una relación de actividad de GUS con respecto a luciferasa y se comparan con los niveles impartidos por el promotor constitutivo y un patrón de intrón conocido, tal como el del intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays*, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102).

55 Para el ensayo de planta estable de los intrones presentados como las SEQ ID NO: 172 a 267 y las SEQ ID NO: 317 a 323 y las SEQ ID NO: 589 a 778, un vector de transformación de plantas de expresión de GUS se construye usando procedimientos conocidos en la técnica similares a las construcciones descritas en los ejemplos previos en los que los vectores de expresión de plantas resultantes contienen una región del extremo derecho de *A. tumefaciens*, un primer casete transgénico de expresión para probar el intrón que comprende un promotor constitutivo tal como el promotor del virus del mosaico de la coliflor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-CaMV.35S-1:1:15 (SEQ ID NO: 1111), unido operativamente en 5' a un elemento intrónico de prueba (SEQ ID NO: 16 a 306), unido operativamente a una secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS) que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091) o sin intrón (GUS-1, SEQ ID NO: 1090), unido operativamente a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRTu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088); un segundo casete transgénico de selección usado para la selección de células

vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el promotor de actina 1 del arroz) o, como alternativa, el antibiótico kanamicina (dirigido por el promotor de actina 1 del arroz) y una región del extremo izquierdo de *A. tumefaciens*. Los plásmidos resultantes se usan para transformar plantas de maíz o plantas de otro género mediante los procedimientos descritos anteriormente o mediante procedimientos mediados por *Agrobacterium* conocidos en la técnica. Los transformantes de copia única o bajo número de copias se seleccionan para comparación con plantas transformadas de copia única o bajo número de copias, transformadas con un vector de transformación de plantas idéntico al vector de prueba pero sin el intrón de prueba para determinar si el intrón de prueba proporciona un efecto mejorado mediado por intrones.

Cualquiera de los intrones presentados como las SEQ ID NO: 172 a 267 y las SEQ ID NO: 317 a 323 y las SEQ ID NO: 589 a 778 se pueden modificar de varias formas, tales como suprimir fragmentos dentro de la secuencia intrónica que pueden reducir la expresión o la duplicación de fragmentos con el intrón que pueden potenciar la expresión. Además, las secuencias dentro del intrón que pueden alterar la especificidad de la expresión para tipos celulares o tejidos y órganos particulares pueden duplicarse o alterarse o suprimirse para alterar la expresión y los patrones de expresión del transgén. Además, los intrones presentados como las SEQ ID NO: 172 a 267 y las SEQ ID NO: 317 a 323 y las SEQ ID NO: 589 a 778 se pueden modificar para eliminar cualquier codón de inicio potencial (ATG) que pueda causar que se expresen transcritos accidentales a partir de intrones con corte y empalme inadecuado como proteínas diferentes, más largas o truncadas. Una vez que el intrón se ha probado empíricamente, o se ha alterado basándose en la experimentación, el intrón se usa para mejorar la expresión de un transgén en plantas transformadas de manera estable que pueden ser de cualquier género de planta monocotiledónea o dicotiledónea, siempre que el intrón proporcione una mejora del transgén. El intrón también se puede usar para mejorar la expresión en otros organismos, tales como algas, hongos o células animales, siempre que el intrón proporcione una mejora o atenuación o especificidad de la expresión del transgén al que está unido operativamente.

Ejemplo 12: Construcciones de plásmidos que comprenden casetes transgénicos para el análisis de la mejora mediada por intrones de la actividad del transgén de GUS

Se clonan elementos intrónicos aislados de *Setaria italica* usando procedimientos conocidos en la técnica en construcciones plasmídicas que comprenden un promotor constitutivo para probar el efecto del intrón sobre la expresión de un transgén de GUS dirigido por un promotor constitutivo.

Los elementos intrónicos presentados como las SEQ ID NO: 179 a 267 se clonaron en construcciones plasmídicas que comprenden un promotor constitutivo, P-CaMV.35S-enh-1:1:13 (SEQ ID NO: 1112), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-CaMV.35S-1:1:15 (SEQ ID NO: 1111), unido operativamente a un elemento intrónico de prueba (SEQ ID NO: 179 a 267), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de GUS, (GUS-1, SEQ ID NO: 1090), unido operativamente en 5' a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). El identificador de la construcción de plásmido junto con cada anotación de intrón se presenta en la tabla 19 a continuación.

Tabla 19. Construcciones de plásmidos que comprenden casetes transgénicos para evaluar la mejora mediada por intrones de la expresión del transgén de GUS.

Construcción	Anotación de intrón	Intrón SEQ ID NO:
pMON138824	I-SETit.14-3-3A-2-1:1:1	179
pMON138826	I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2	180
pMON138816	I-SETit.14-3-3 A-4-1:1:2	181
pMON138813	I-SETit.14-3-3A-5-1:1:2	182
pMON138829	I-SETit.14-3-3B-2-1:1:1	183
pMON138830	I-SETit.14-3-3B-3-1:1:2	184
pMON138820	I-SETit.14-3-3B-4-1:1:2	185
pMON138821	I-SETit.14-3-3B-5-1:1:2	186
pMON138831	I-SETit. 14-3-3C-1-1:1:1	187
pMON138823	I-SETit.14-3-3C-2-1:1:1	188
pMON138817	I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2	189
pMON138832	I-SETit. 14-3-30-4-1:1:2	190
pMON138822	I-SETit. 14-3-3C-5-1:1:2	191
pMON138825	I-SETit.14-3-3D-1-1:1:2	192
pMON138828	I-SETit.14-3-3D-2-1:1:1	193
pMON138814	I-SETit.14-3-3D-3-1:1:2	194
pMON138827	I-SETit.4-3-3D-4-1:1:3	195
pMON138843	I-SETit.14-3-3D-5-1:1:2	196
pMON138835	I-SETit.14-3-3E-2-1:1:1	197
pMON138836	I-SETit.14-3-3E-3-1:1:2	198
pMON138845	I-SETit.14-3-3E-4-1:1:2	199
pMON138841	I-SETit.14-3-3E-5-1:1:2	200
pMON138794	I-SETit.40S-7S-1 1-1:1:2	201
pMON138792	I-SETit.40S-7S-1 2-1:1:2	202

(continuación)

Construcción	Anotación de intrón	Intrón SEQ ID NO:
pMON138791	I-SETit.40S-7S-1 3-1:1:2	203
pMON138788	I-SETit.40S-7S-1 4-1:1:2	204
pMON138798	I-SETit.40S-7S-2 2-1:1:1	205
pMON138802	I-SETit.40S-7S-2 3-1:1:1	206
pMON138807	I-SETit.40S-7S-2 4-1:1:1	207
pMON138809	I-SETit.40S-7S-3 1-1:1:2	208
pMON138810	I-SETit.40S-7S-3 2-1:1:2	209
pMON138800	I-SETit.40S-7S-3 3-1:1:2	210
pMON138837	I-SETit.60S L10A1-1-1:1:2	211
pMON138847	I-SETit.60S L10A1-2-1:1:2	212
pMON138840	I-SETit.60S L10A1-3-1:1:2	213
pMON140752	I-SETit.60S L10A1-4-1:1:1	214
pMON140750	I-SETit.60S L10A1-5-1:1:2	215
pMON140758	I-SETit.ASA2-3-1:1:2	216
pMON140757	I-SETit.ClpD-1-1:1:1	217
pMON138783	I-SETit.DnaJ 1-1:1:2	218
pMON138848	I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2	219
pMON138786	I-SETit.eEF1g 1-1:1:2	220
pMON138787	I-SETit.eEF1g 4-1:1:3	221
pMON138842	I-SETit.eIF5A1-1-1:1:1	222
pMON138833	I-SETit.eIF5A1-2-1:1:2	223
pMON138844	I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2	224
pMON138834	I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2	225
pMON140751	I-SETit.eIF5A1-5-1:1:2	226
pMON138838	I-SETit.eIF5A2-1-1:1:2	227
pMON138839	I-SETit.eIF5A2-2-1:1:3	228
pMON138846	I-SETit.eIF5A2-3-1:1:2	229
pMON138849	I-SETit.eIF5A2-4-1:1:2	230
pMON140756	I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2	231
pMON140753	I-SETit.eIF5A3-1-1:1:1	232
pMON140769	I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2	233
pMON140754	I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2	234
pMON140760	I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2	235
pMON140763	I-SETit.eIF5A3-5-1:1:2	236
pMON138808	I-SETit.GAD 1-1:1:2	237
pMON138819	I-SETit.GAD 2-1:1:2	238
pMON138815	I-SETit.GAD 3-1:1:2	239
pMON138818	I-SETit.GAD 4-1:1:2	240
pMON140765	I-SETit.Gr1-3-1:1:1	241
pMON138806	I-SETit.GRP-1-1:1:1	242
pMON140768	I-SETit.LSm8-1-1:1:2	243
pMON140767	I-SETit.LSm8-2-1:1:1	244
pMON140771	I-SETit.LSm8-3-1:1:1	245
pMON140762	I-SETit.LSm8-4-1:1:2	246
pMON138812	I-SETit.PGK3 1-1:1:2	247
pMON138804	I-SETit.PGK3 2-1:1:1	248
pMON138793	I-SETit.PIP1 1 2-1:1:1	249
pMON138797	I-SETit.PIP1-1 1-1:1:1	250
pMON138796	I-SETit.PIP1-1 3-1:1:2	251
pMON138785	I-SETit.PIP1-4 3-1:1:2	252
pMON138784	I-SETit.PIP2-2 2-1:1:2	253
pMON138789	I-SETit.PIP2-2 3-1:1:2	254
pMON138790	I-SETit.PIP2-5 2-1:1:2	255
pMON138795	I-SETit.PIP2-5 3-1:1:2	256
pMON140764	I-SETit.Prx17-2-1:1:1	257
pMON140766	I-SETit.Prx3-1-1:1:2	258
pMON140770	I-SETit.SBD-1-1:1:2	259
pMON140761	I-SETit.SBD-2-1:1:1	260
pMON140759	I-SETit.SBD-3-1:1:2	261
pMON138799	I-SETit.TubA2 1-1:1:1	262
pMON138801	I-SETit.TubA2 2-1:1:1	263
pMON138805	I-SETit.TubA2 3-1:1:1	264

pMON138811	I-SETit.TubA3 1-1:1:1	265
pMON138803	I-SETit.TubA3 2-1:1:1	266
pMON140755	I-SETit.Wx1-1-1:1:2	267

Cada plásmido se usó como molde para la amplificación por PCR del casete transgénico para su uso en el ensayo de protoplastos como se describe a continuación.

Ejemplo 13: Análisis de la mejora mediada por intrones de la actividad GUS usando protoplastos de maíz

5 Se transforman células protoplásticas, procedentes del tejido de la hoja de maíz, con casetes transgénicos en forma de amplicones de PCR para determinar el efecto de cada intrón en la expresión del transgén, GUS, dirigido por un promotor constitutivo y en comparación con intrones que se sabe que tienen un efecto de mejora en la expresión del transgén.

10 Las construcciones descritas en el ejemplo 12 anterior y presentadas en la tabla 19 del ejemplo 12 se usaron como molde para generar amplicones de PCR usando procedimientos conocidos en la técnica que comprenden un promotor constitutivo, P-CaMV.35S-enh-1:1:13 (SEQ ID NO: 1112), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-CaMV.35S-1:1:15 (SEQ ID NO: 1111), unido operativamente a un elemento intrónico de prueba (SEQ ID NO: 179 a 267), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de GUS, (GUS-1, SEQ ID NO: 1090), unido operativamente en 5' a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRTu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). Además, también se generaron amplicones procedentes de plásmidos de control usando los mismos procedimientos de amplificación de las construcciones de plásmidos de control, pMON19469, pMON65328, pMON25455, pMON8677 y pMON33449. El casete transgénico de pMON19469 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh/I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1104) y proporciona una comparación del promotor constitutivo mejorado usando el intrón I-Zm.DnaK-1:1:1. El casete transgénico de pMON65328 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1/I-Os.Act1-1:1:9 (SEQ ID NO: 1105) y proporciona una comparación de la mejora del promotor constitutivo usando el intrón, I-Os.Act1-1:1:9. El casete transgénico de pMON25455 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098) y proporciona una comparación de la expresión usando el promotor nativo, líder e intrón del gen de actina 1 del arroz. El casete transgénico de pMON8677 comprende el promotor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096) unido operativamente a la secuencia codificante de GUS y proporciona una comparación de la expresión con un promotor constitutivo sin un intrón para mejora. El casete transgénico de pMON33449 comprende una variante del promotor 35S de CaMV (P-E35S:1:52, SEQ ID NO: 1117) y proporciona un comparador adicional que carece de un intrón.

30 Se transforman células protoplásticas, procedentes de tejido de hoja de maíz, usando procedimientos de transformación basados en PEG conocidos en la técnica. En resumen, cada construcción de prueba y control se usa para proporcionar un molde para la amplificación del casete transgénico que comprende cada construcción. El amplicón resultante se fracciona por tamaños en un gel de agarosa y el ADN del amplicón se escinde del gel. El ADN del amplicón se extrae del fragmento de gel usando procedimientos conocidos en la técnica y se cuantifica mediante espectrofotometría. Se transforman células protoplásticas usando procedimientos de PEG conocidos en la técnica y usando 0,3 o 0,1 picomoles de ADN de amplicón de PCR. Se realizan de dos a cuatro repeticiones para cada transformación y se determina la expresión promedio impartida por cada construcción. La expresión de GUS media observada para cada amplicón procedente de construcción se normaliza con respecto a la expresión observada para el amplicón procedente de pMON19469 que comprende el elemento intrónico, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102). Las tablas 20 y 21 a continuación muestran la expresión promedio normalizada de GUS impartida a amplicones procedentes de las construcciones presentadas en la tabla 19 del ejemplo 12 en relación con la expresión promedio de GUS impartida a amplicones procedentes de los plásmidos de control descritos anteriormente usando 0,3 y 0,1 pmol de amplicón, respectivamente.

Tabla 20. Mejora mediada por intrones de la expresión de GUS en protoplastos de maíz en relación con I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102) usando 0,3 pmol de ADN de amplicón.

Construcción	Anotación de intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación típica
pMON138842	SETite.eIF5A1-1-1:1:1	222	3,19777	0,14472
pMON140750	I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:2	215	2,73551	0,14472
pMON138806	I-SETit.GRP-1-1:1:1	242	2,24406	0,16711
pMON140768	I-SETit.LSm8-1-1:1:2	243	1,79949	0,14472
pMON138847	I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:2	212	1,76055	0,14472
pMON138805	I-SETit.TubA2 3-1:1:1	264	1,6441	0,16711
pMON138826	I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2	180	1,59333	0,14472
pMON138844	I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2	224	1,51864	0,16711
pMON138845	I-SETit.14-3-3E-4-1:1:2	199	1,47841	0,14472
pMON138785	I-SETit.PIP1-4_3-1:1:2	252	1,45536	0,14472
pMON138812	I-SETit.PGK31-1:1:2	247	1,36129	0,14472
pMON138809	I-SETit.40S-7S-31-1:1:2	208	1,35665	0,14472
pMON138796	I-SETit.PIP1-1_3-1:1:2	251	1,30268	0,14472

(continuación)

Construcción	Anotación de intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación típica
pMON140762	I-SETit.LSm8-4-1:1:2	246	1,28583	0,14472
pMON138839	I-SETit.eIF5A2-2-1:1:3	228	1,26341	0,16711
pMON138836	I-SETit.14-3-3E-3-1:1:2	198	1,23008	0,14472
pMON140767	I-SETit.LSm8-2-1:1:1	244	1,22373	0,14472
pMON138824	I-SETit.14-3-3A-2-1:1:1	179	1,2226	0,16711
pMON140754	I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2	234	1,22009	0,14472
pMON138829	I-SETit.14-3-3B-2-1:1:1	183	1,17955	0,14472
pMON138827	I-SETit.4-3-3D-4-1:1:3	195	1,15355	0,14472
pMON138831	I-SETit.14-3-3C-1-1:1:1	187	1,13972	0,20467
pMON138817	I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2	189	1,09812	0,14472
pMON138783	I-SETit.DnaJ 1-1:1:2	218	1,08489	0,14472
pMON140769	I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2	233	1,0434	0,14472
pMON138792	I-SETit.40S-7S-1 2-1:1:2	202	1,04308	0,16711
pMON140760	I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2	235	1,04187	0,14472
pMON140758	I-SETit.ASA2-3-1:1:2	216	1,01034	0,14472
pMON19469	I-Zm.DnaK-1:1:1	1102	1	0,14472
pMON140761	I-SETit.SBD-2-1:1:1	260	0,99105	0,16711
pMON138794	I-SETit.40S-7S-1 1-1:1:2	201	0,98962	0,14472
pMON138789	I-SETit.PIP2-2 3-1:1:2	254	0,96195	0,14472
pMON138791	I-SETit.40S-7S-1 3-1:1:2	203	0,94544	0,14472
pMON138830	I-SETit.14-3-3B-3-1:1:2	184	0,92124	0,16711
pMON140766	I-SETit.Prx3-1-1:1:2	258	0,88915	0,14472
pMON138803	I-SETit.TubA3 2-1:1:1	266	0,83768	0,16711
pMON138832	I-SETit.14-3-3C-4-1:1:2	190	0,80355	0,14472
pMON138848	I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2	219	0,7898	0,16711
pMON138835	I-SETit.14-3-3E-2-1:1:1	197	0,78927	0,14472
pMON138834	I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2	225	0,77272	0,14472
pMON138821	I-SETit.14-3-3B-5-1:1:2	186	0,671	0,14472
pMON138849	I-SETit.eIF5A2-4-1:1:2	230	0,67063	0,14472
pMON138786	I-SETit.eEF1g 1-1: 1:2	220	0,6574	0,16711
pMON140756	I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2	231	0,6269	0,16711
pMON65328	I-Os.Act1-1:1:19	1113	0,58395	0,14472
pMON138840	I-SETit.60S L10A1-3-1:1:2	213	0,57366	0,14472
pMON138822	I-SETit.14-3-3C-5-1:1:2	191	0,55845	0,14472
pMON140757	I-SETit.ClpD-1-1:1:1	217	0,53607	0,14472
pMON140753	I-SETit.eIF5A3-1-1:1:1	232	0,52545	0,14472
pMON138820	I-SETit.14-3-3B-4-1:1:2	185	0,52034	0,16711
pMON138800	I-SETit.40S-7S-3 3-1:1:2	210	0,51862	0,16711
pMON138828	I-SETit.14-3-3D-2-1:1:1	193	0,51592	0,14472
pMON138813	I-SETit.14-3-3A-5-1:1:2	182	0,51379	0,14472
pMON138843	I-SETit.14-3-3D-5-1:1:2	196	0,50543	0,14472
pMON138825	I-SETit.14-3-3D-1-1:1:2	192	0,48895	0,14472
pMON138814	I-SETit.14-3-3D-3-1:1:2	194	0,48519	0,14472
pMON138818	I-SETit.GAD 4-1:1:2	240	0,47986	0,14472
pMON138811	I-SETit.TubA3 1-1:1:1	265	0,47762	0,16711
pMON138823	I-SETit.14-3-3C-2-1:1:1	188	0,41543	0,14472
pMON138837	I-SETit.60S L10A1-1-1:1:2	211	0,40991	0,14472
pMON138846	I-SETit.eIF5A2-3-1:1:2	229	0,40485	0,14472
pMON140763	I-SETit.eIF5A3-5-1:1:2	236	0,40131	0,14472
pMON138838	I-SETit.eIF5A2-1-1:1:2	227	0,37694	0,14472
pMON138801	I-SETit.TubA2 2-1:1:1	263	0,35386	0,14472
pMON138804	I-SETit.PGK3 2-1:1:1	248	0,35284	0,16711
pMON140765	I-SETit.Grf1-3-1:1:1	241	0,32325	0,16711
pMON140755	I-SETit.Wx1-1-1:1:2	267	0,31895	0,16711
pMON138790	I-SETit.PIP2-5 2-1:1:2	255	0,2957	0,16711
pMON140770	I-SETit.SBD-1-1:1:2	259	0,29309	0,14472
pMON138784	I-SETit.PIP2-2 2-1:1:2	253	0,29174	0,14472
pMON138808	I-SETit.GAD 1-1:1:2	237	0,2874	0,14472
pMON138807	I-SETit.40S-7S-2 4-1:1:1	207	0,27522	0,16711
pMON138819	I-SETit.GAD 2-1:1:2	238	0,27038	0,14472
pMON138833	I-SETit.eIF5A1 -2-1:1:2	223	0,25147	0,14472

pMON138795	I-SETit.PIP2-5_3-1:1:2	256	0,24221	0,14472
pMON138802	I-SETit.40S-7S-2_3-1:1:1	206	0,23983	0,16711
pMON25455 EXP-Os.Act1 (SEQ ID NO: 1098)	EXP-Os.Act1		0,21736	0,16711
pMON140759	I-SETit.SBD-3-1:1:2	261	0,2172	0,16711
pMON138787	I-SETit.eEF1g_4-1:1:3	221	0,17568	0,14472
pMON138810	I-SETit.40S-7S-3_2-1:1:2	209	0,16997	0,14472
pMON138816	I-SETit.14-3-3A-4-1:1:2	181	0,16765	0,14472
pMON138815	I-SETit.GAD_3-1:1:2	239	0,16017	0,20467
pMON138788	I-SETit.40S-7S-1_4-1:1:2	204	0,15842	0,16711
pMON140752	I-SETit.60S_L10A1-4-1:1:1	214	0,15302	0,14472
pMON140751	I-SETit.eIF5A1-5-1:1:2	226	0,14712	0,14472
pMON138841	I-SETit.14-3-3E-5-1:1:2	200	0,14157	0,14472
pMON8677	Sin intrón		0,14109	0,14472
pMON138798	I-SETit.40S-7S-2_2-1:1:1	205	0,11752	0,16711
pMON138793	I-SETit.PIP1_1_2-1:1:1	249	0,11305	0,14472
pMON33449	Sin intrón		0,10504	0,14472
pMON140764	I-SETit.Prx17-2-1:1:1	257	0,10398	0,16711
pMON140771	I-SETit.LSm8-3-1:1:1	245	0,09975	0,14472
pMON138797	I-SETit.PIP1-1_1-1:1:1	250	0,03152	0,14472
pMON138799	I-SETit.TubA2_1-1:1:1	262	0,01853	0,14472
Sin ADN			0,001	0,20467

Usando 0.3 pmol de amplicón, la mayoría de los elementos intrónicos de prueba, procedentes de *S. italica*, expresión de GUS mejorada en relación con los controles sin intrón usando un promotor similar (pMON8677 y pMON33449). Se observó mejora potenciada de la expresión de GUS, en relación con el elemento intrónico, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102) para los elementos intrónicos, I-SETit.eIF5A1-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 222), I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 215), I-SETit.GRP-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 242), I-SETit.LSm8-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 243), I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 212), I-SETit.TubA2_3-1:1:1 (SEQ ID NO: 264), I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 180), I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 224), I-SETit.14-3-3E-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 199), I-SETit.PIP1-4_3-1:1:2 (SEQ ID NO: 252), I-SETit.PGK3_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 247), I-SETit.40S-7S-3_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 208), I-SETit.PIPI-1-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 251), I-SETit.LSm8-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 246), I-SETit.eIF5A2-2-1:1:3 (SEQ ID NO: 228), I-SETit.14-3-3E-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 198), I-SETit.LSm8-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 244), I-SETit.14-3-3A-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 179), I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 234), I-SETit.14-3-3B-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 183), I-SETit.14-3-3D-4-1:1:3 (SEQ ID NO: 195), I-SETit.14-3-3C-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 187), I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 189), I-SETit.DnaJ_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 218), I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 233), I-SETit.40S-7S-1_2-1:1:2 (SEQ ID NO: 202), I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 235) y I-SETit.ASA2-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 216). Los datos se muestran en la tabla 21 a continuación.

Tabla 21. Mejora mediada por intrones de la expresión de GUS en protoplastos de maíz en relación con I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102) usando 0,1 pmol de ADN de amplicón.

Construcción	Anotación de intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación típica
pMON138842	I-SETit.eIF5A1-1-1:1:1	222	3,19777	0,14472
pMON140750	I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:2	215	2,73551	0,14472
pMON138806	I-SETit.GRP-1-1:1:1	242	2,24406	0,16711
pMON140768	I-SETit.LSm8-1-1:1:2	243	1,79949	0,14472
pMON138847	I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:2	212	1,76055	0,14472
pMON138805	I-SETit.TubA2_3-1:1:1	264	1,6441	0,16711
pMON138826	I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2	180	1,59333	0,14472
pMON138844	I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2	224	1,51864	0,16711
pMON138845	I-SETit.14-3-3E-4-1:1:2	199	1,47841	0,14472
pMON138785	I-SETit.PIP1-4_3-1:1:2	252	1,45536	0,14472
pMON138812	I-SETit.PGK31-1:1:2	247	1,36129	0,14472
pMON138809	I-SETit.40S-7S-3_1-1:1:2	208	1,35665	0,14472
pMON138796	I-SETit.PIP1-1_3-1:1:2	251	1,30268	0,14472
pMON140762	I-SETit.LSm8-4-1:1:2	246	1,28583	0,14472
pMON138839	I-SETit.eIF5A2-2-1:1:3	228	1,26341	0,16711

(continuación)

Construcción	Anotación de intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación típica
pMON138836	I-SETit.14-3-3E-3-1:1:2	198	1,23008	0,14472
pMON140767	I-SETit.LSm8-2-1:1:1	244	1,22373	0,14472
pMON138824	I-SETit.14-3-3A-2-1:1:1	179	1,2226	0,16711
pMON140754	I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2	234	1,22009	0,14472
pMON138829	I-SETit.14-3-3B-2-1:1:1	183	1,17955	0,14472
pMON138827	I-SETit.4-3-3D-4-1:1:3	195	1,15355	0,14472
pMON138831	I-SETit.14-3-3C-1-1:1:1	187	1,13972	0,20467
pMON138817	I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2	189	1,09812	0,14472
pMON138783	I-SETit.DnaJ 1-1:1:2	218	1,08489	0,14472
pMON140769	I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2	233	1,0434	0,14472
pMON138792	I-SETit.40S-7S-1_2-1:1:2	202	1,04308	0,16711
pMON140760	I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2	235	1,04187	0,14472
pMON140758	I-SETit.ASA2-3-1:1:2	216	1,01034	0,14472
pMON19469	I-Zm.DnaK-1:1:1	1102	1	0,14472
pMON140761	I-SETit.SBD-2-1:1:1	260	0,99105	0,16711
pMON138794	I-SETit.40S-7S-1_1-1:1:2	201	0,98962	0,14472
pMON138789	I-SETit.PIP2-2_3-1:1:2	254	0,96195	0,14472
pMON138791	I-SETit.40S-7S-1_3-1:1:2	203	0,94544	0,14472
pMON138830	I-SETit.14-3-3B-3-1:1:2	184	0,92124	0,16711
pMON140766	I-SETit.Prx3-1-1:1:2	258	0,88915	0,14472
pMON138803	I-SETit.TubA3 2-1:1:1	266	0,83768	0,16711
pMON138832	I-SETit.14-3-3C-4-1:1:2	190	0,80355	0,14472
pMON138848	I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2	219	0,7898	0,16711
pMON138835	I-SETit.14-3-3E-2-1:1:1	197	0,78927	0,14472
pMON138834	I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2	225	0,77272	0,14472
pMON138821	I-SETit.14-3-3B-5-1:1:2	186	0,671	0,14472
pMON138849	I-SETit.eIF5A2-4-1:1:2	230	0,67063	0,14472
pMON138786	I-SETit.eEF1g_1-1:1:2	220	0,6574	0,16711
pMON140756	I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2	231	0,6269	0,16711
pMON65328	I-Os.Act1-1:1:19	1113	0,58395	0,14472
pMON138840	I-SETit.60S_L10A1-3-1:1:2	213	0,57366	0,14472
pMON138822	I-SETit.14-3-3C-5-1:1:2	191	0,55845	0,14472
pMON140757	I-SETit.ClpD-1-1:1:1	217	0,53607	0,14472
pMON140753	I-SETit.eIF5A3-1-1:1:1	232	0,52545	0,14472
pMON138820	I-SETit.14-3-3B-4-1:1:2	185	0,52034	0,16711
pMON138800	I-SETit.40S-7S-3_3-1:1:2	210	0,51862	0,16711
pMON138828	I-SETit.14-3-3D-2-1:1:1	193	0,51592	0,14472
pMON138813	I-SETit.14-3-3A-5-1:1:2	182	0,51379	0,14472
pMON138843	I-SETit.14-3-3D-5-1:1:2	196	0,50543	0,14472
pMON138825	I-SETit.14-3-3D-1-1:1:2	192	0,48895	0,14472

(continuación)

Construcción	Anotación de intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación típica
pMON138814	I-SETit.14-3-3D-3-1:1:2	194	0,48519	0,14472
pMON138818	I-SETit.GAD 4-1:1:2	240	0,47986	0,14472
pMON138811	I-SETit.TubA3 1-1:1:1	265	0,47762	0,16711
pMON138823	I-SETit.14-3-3C-2-1:1:1	188	0,41543	0,14472
pMON138837	I-SETit.60S_L10A1-1-1:1:2	211	0,40991	0,14472
pMON138846	I-SETit.eIF5A2-3-1:1:2	229	0,40485	0,14472
pMON140763	I-SETit.eIF5A3-5-1:1:2	236	0,40131	0,14472
pMON138838	I-SETit.eIF5A2-1-1:1:2	227	0,37694	0,14472
pMON138801	I-SETit.TubA2 2-1:1:1	263	0,35386	0,14472
pMON138804	I-SETit.PGK3 2-1:1:1	248	0,35284	0,16711
pMON140765	I-SETit.Grf1-3-1:1:1	241	0,32325	0,16711
pMON140755	I-SETit.Wx1-1-1:1:2	267	0,31895	0,16711
pMON138790	I-SETit.PIP2-5 2-1:1:2	255	0,2957	0,16711
pMON140770	I-SETit.SBD-1-1:1:2	259	0,29309	0,14472
pMON138784	I-SETit.PIP2-2_2-1:1:2	253	0,29174	0,14472
pMON138808	I-SETit.GAD 1-1:1:2	237	0,2874	0,14472
pMON138807	I-SETit.40S-7S-2 4-1:1:1	207	0,27522	0,16711
pMON138819	I-SETit.GAD 2-1:1:2	238	0,27038	0,14472
pMON138833	I-SETit.eIF5A1 -2-1:1:2	223	0,25147	0,14472
pMON138795	I-SETit.PIP2-5 3-1:1:2	256	0,24221	0,14472
pMON138802	I-SETit.40S-7S-2_3-1:1:1	206	0,23983	0,16711
pMON25455 EXP-Os.Act1 (SEQ ID NO: 1098)	EXP-Os.Act1		0,21736	0,16711
pMON140759	I-SETit.SBD-3-1:1:2	261	0,2172	0,16711
pMON138787	I-SETit.eEF1g_4-1:1:3	221	0,17568	0,14472
pMON138810	I-SETit.40S-7S-3_2-1:1:2	209	0,16997	0,14472
pMON138816	I-SETit.14-3-3A-4-1:1:2	181	0,16765	0,14472
pMON138815	I-SETit.GAD 3-1:1:2	239	0,16017	0,20467
pMON138788	I-SETit.40S-7S-1_4-1:1:2	204	0,15842	0,16711
pMON140752	I-SETit.60S_L10A1-4-1:1:1	214	0,15302	0,14472
pMON140751	I-SETit.eIF5A1-5-1:1:2	226	0,14712	0,14472
pMON138841	I-SETit.14-3-3E-5-1:1:2	200	0,14157	0,14472
pMON8677	Sin intrón		0,14109	0,14472
pMON138798	I-SETit.40S-7S-2_2-1:1:1	205	0,11752	0,16711
pMON138793	I-SETit.PIP1_1 2-1:1:1	249	0,11305	0,14472
pMON33449	Sin intrón		0,10504	0,14472
pMON140764	I-SETit.Prx17-2-1:1:1	257	0,10398	0,16711
pMON140771	I-SETit.LSm8-3-1:1:1	245	0,09975	0,14472
pMON138797	I-SETit.PIP1-1 1-1:1:1	250	0,03152	0,14472
pMON138799	I-SETit.TubA2 1-1:1:1	262	0,01853	0,14472
Sin ADN			0,001	0,20467

La tendencia básica en la mejora fue similar usando 0,1 pmol de amplicón. La mayoría de los elementos intrónicos de prueba, procedentes de *S. italica*, expresión de GUS mejorada en relación con los controles sin intrón usando un promotor similar (pMON8677 y pMON33449). Mejora potenciada de la expresión de GUS, en relación con el elemento intrónico, Se observó I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102) usando los elementos intrónicos, I-SETit.LSm8-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 243), I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 215), I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 224), I-SETit.GRP-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 242), I-SETit.14-3-3D-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 193), I-SETit.14-3-3D-3-1:1:2 (SEQ ID

NO: 194), I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 234), I-SETit.LSm8-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 246), I-SETit.LSm8-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 244), I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 233), I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 225), I-SETit.ASA2-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 216), I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 212), I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 231), I-SETit.14-3-3B-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 184), I-SETit. 14-3-3B-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 183), I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 219), I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 180), I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 235), I-SETit.14-3-3C-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 191), I-SETit.TubA3_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 266), I-SETit.40S-7S-1_3-1:1:2 (SEQ ID NO: 203), I-SETit.TubA2_3-1:1:1 (SEQ ID NO: 264), I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 189), I-SETit.Prx3-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 258) e I-SETit.DnaJ_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 218).

Ejemplo 14: Análisis de la mejora mediada por intrones de la actividad GUS usando protoplastos de trigo

Se transforman células protoplásticas, procedentes del tejido de la hoja de trigo, con casetes transgénicos en forma de amplicones de PCR para determinar el efecto de cada intrón en la expresión del transgén, GUS, dirigido por un promotor constitutivo y en comparación con intrones que se sabe que tienen un efecto de mejora en la expresión del transgén.

Las construcciones descritas en el ejemplo 12 anterior y presentadas en la tabla 19 del ejemplo 12 se usaron como molde para generar amplicones de PCR usando procedimientos conocidos en la técnica que comprenden un promotor constitutivo, P-CaMV.35S-enh-1:1:13 (SEQ ID NO: 1112), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-CaMV.35S-1:1:15 (SEQ ID NO: 1111), unido operativamente a un elemento intrónico de prueba (SEQ ID NO: 179 a 267), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de GUS, (GUS-1, SEQ ID NO: 1090), unido operativamente en 5' a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRTu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). Además, también se generaron amplicones procedentes de plásmidos de control usando los mismos procedimientos de amplificación de las construcciones de plásmidos de control, pMON19469, pMON65328, pMON25455, pMON8677 y pMON33449. El casete transgénico de pMON19469 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh/I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1104) y proporciona una comparación del promotor constitutivo mejorado usando el intrón I-Zm.DnaK-1:1:1. El casete transgénico de pMON65328 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1/I-Os.Act1-1:1:9 (SEQ ID NO: 1105) y proporciona una comparación de la mejora del promotor constitutivo usando el intrón, I-Os.Act1-1:1:9. El casete transgénico de pMON25455 comprende el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098) y proporciona una comparación de la expresión usando el promotor nativo, líder e intrón del gen de actina 1 del arroz. El casete transgénico de pMON8677 comprende el promotor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096) unido operativamente a la secuencia codificante de GUS y proporciona una comparación de la expresión con un promotor constitutivo sin un intrón para mejora. El casete transgénico de pMON33449 comprende una variante del promotor 35S de CaMV (P-E35S:1:52, SEQ ID NO: 1117) y proporciona un comparador adicional que carece de un intrón.

Se transforman células protoplásticas, procedentes de tejido de hoja de trigo, usando procedimientos de transformación basados en PEG conocidos en la técnica. En resumen, cada construcción de prueba y control se usa para proporcionar un molde para la amplificación del casete transgénico que comprende cada construcción. El amplicón resultante se fracciona por tamaños en un gel de agarosa y el ADN del amplicón se escinde del gel. El ADN del amplicón se extrae del fragmento de gel usando procedimientos conocidos en la técnica y se cuantifica mediante espectrofotometría. Se transforman células protoplásticas usando procedimientos de PEG conocidos en la técnica y usando 0,1 picomoles de ADN de amplicón de PCR. Se realizan de dos a cuatro repeticiones para cada transformación y se determina la expresión promedio impartida por cada construcción. La expresión de GUS media observada para cada amplicón procedente de construcción se normaliza con respecto a la expresión observada para el amplicón procedente de pMON19469 que comprende el elemento intrónico, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102). Las tablas 22 a continuación muestran la expresión promedio normalizada de GUS impartida a amplicones procedentes de las construcciones presentadas en la tabla 19 del ejemplo 12 en relación con la expresión promedio de GUS impartida a amplicones procedentes de los plásmidos de control descritos anteriormente usando 0,1 pmol de amplicón.

Tabla 22. Mejora mediada por intrones de la expresión de GUS en protoplastos de trigo en relación con I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102).

Construcción	Anotación de intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación típica
pMON140768	I-SETit.LSm8-1-1:1:2	243	2,26	0,51
pMON140750	I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:2	215	2,14	0,62
pMON65328	I-Os.Act1-1:1:19	1113	2,06	0,96
pMON138844	I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2	224	1,92	0,29
pMON138806	I-SETit.GRP-1-1:1:1	242	1,81	0,64

(continuación)

Construcción	Anotación de intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación típica
pMON138828	I-SETit.14-3-3D-2-1:1:1	193	1,75	0,71
pMON138814	I-SETit.14-3-3D-3-1:1:2	194	1,71	0,26
pMON140754	I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2	234	1,66	0,61
pMON140762	I-SETit.LSm8-4-1:1:2	246	1,6	0,52
pMON140767	I-SETit.LSm8-2-1:1:1	244	1,55	0,26
pMON140769	I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2	233	1,53	0,52
pMON138834	I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2	225	1,44	0,67
pMON140758	I-SETit.ASA2-3-1:1:2	216	1,37	0,25
pMON138847	I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:2	212	1,34	1,03
pMON140756	I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2	231	1,33	0,53
pMON138830	I-SETit.14-3-3B-3-1:1:2	184	1,2	0,23
pMON138829	I-SETit.14-3-3B-2-1:1:1	183	1,18	0,41
pMON138848	I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2	219	1,17	0,1
pMON138826	I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2	180	1,12	0,23
pMON140760	I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2	235	1,12	0,49
pMON138822	I-SETit. 14-3-3C-5-1:1:2	191	1,1	0,33
pMON138803	I-SETit.TubA3_2-1:1:1	266	1,08	0,19
pMON138791	I-SETit.40S-7S-1 3-1:1:2	203	1,06	0,13
pMON138805	I-SETit.TubA2 3-1:1:1	264	1,03	0,34
pMON138817	I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2	189	1,03	0,16
pMON140766	I-SETit.Prx3-1-1:1:2	258	1,03	0,45
pMON138783	I-SETit.DnaJ 1-1:1:2	218	1,02	0,43
pMON19469	I-Zm.DnaK-1:1:1	1102	1	0,96
pMON138846	I-SETit.eIF5A2-3-1:1:2	229	0,99	0,62
pMON138819	I-SETit.GAD 2-1:1:2	238	0,98	0,4
pMON140753	I-SETit.eIF5A3-1-1:1:1	232	0,98	0,16
pMON138835	I-SETit.14-3-3E-2-1:1:1	197	0,97	0,17
pMON138836	I-SETit.14-3-3E-3-1:1:2	198	0,95	0,36
pMON138837	I-SETit.60S_L10A1-1-1:1:2	211	0,93	0,57
pMON138813	I-SETit.14-3-3A-5-1:1:2	182	0,92	0,32
pMON138849	I-SETit.eIF5A2-4-1:1:2	230	0,9	0,3
pMON138809	I-SETit.40S-7S-3 1-1:1:2	208	0,88	0,41
pMON140770	I-SETit.SBD-1-1:1:2	259	0,84	0,5

(continuación)

Construcción	Anotación de intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación típica
pMON138811	I-SETit.TubA3 1-1:1:1	265	0,83	0,12
pMON138833	I-SETit.eIF5A1-2-1:1:2	223	0,83	0,56
pMON140761	I-SETit.SBD-2-1:1:1	260	0,82	0,18
pMON138832	I-SETit.14-3-3C-4-1:1:2	190	0,77	0,44
pMON140757	I-SETit.ClpD-1-1:1:1	217	0,77	0,52
pMON140759	I-SETit.SBD-3-1:1:2	261	0,76	0,36
pMON138812	I-SETit.PGK3 1-1:1:2	247	0,75	0,45
pMON140763	I-SETit.eIF5A3-5-1:1:2	236	0,75	0,22
pMON138824	I-SETit.14-3-3A-2-1:1:1	179	0,74	0,39
pMON138839	I-SETit.eIF5A2-2-1:1:3	228	0,73	0,12
pMON33449	Sin intrón		0,68	0,47
pMON138841	I-SETit.14-3-3E-5-1:1:2	200	0,67	0,35
pMON138827	I-SETit.14-3-3D-4-1:1:3	195	0,63	0,45
pMON138815	I-SETit.GAD 3-1:1:2	239	0,6	0,15
pMON25455 EXP-Os.Act1 (SEQ ID NO: 1098)	EXP-Os.Act1		0,57	0,49
pMON138804	I-SETit.PGK3 2-1:1:1	248	0,56	0,42
pMON138823	I-SETit.14-3-3C-2-1:1:1	188	0,54	0,21
pMON140752	I-SETit.60S L10A1-4-1:1:1	214	0,52	0,46
pMON140755	I-SETit.Wx1-1-1:1:2	267	0,52	0,41
pMON138816	I-SETit.14-3-3A-4-1:1:2	181	0,51	0,2
pMON138808	I-SETit.GAD 1-1:1:2	237	0,5	0,42
pMON138820	I-SETit.14-3-3B-4-1:1:2	185	0,5	0,35
pMON138831	I-SETit.14-3-3C-1-1:1:1	187	0,49	0,42
pMON138838	I-SETit.eIF5A2-1-1:1:2	227	0,49	0,39
pMON138792	I-SETit.40S-7S-1 2-1:1:2	202	0,47	0,49
pMON138799	I-SETit.TubA2 1-1:1:1	262	0,47	0,15
pMON140765	I-SETit.Grf1-3-1:1:1	241	0,47	0,38
pMON138843	I-SETit.14-3-3D-5-1:1:2	196	0,46	0,49
pMON140771	I-SETit.LSm8-3-1:1:1	245	0,43	0,25
pMON138789	I-SETit.PIP2-2_3-1:1:2	254	0,42	0,26
pMON138794	I-SETit.40S-7S-1 1-1:1:2	201	0,4	0,28
pMON138788	I-SETit.40S-7S-1 4-1:1:2	204	0,39	0,32
pMON138840	I-SETit.60S_L10A1-3-1:1:2	213	0,39	0,35
pMON140751	I-SETit.eIF5A1-5-1:1:2	226	0,39	0,48
pMON138785	I-SETit.PIP1-4 3-1:1:2	252	0,38	0,33

(continuación)

Construcción	Anotación de intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación típica
pMON8677	Sin intrón		0,38	0,36
pMON138821	I-SETit.14-3-3B-5-1:1:2	186	0,37	0,23
pMON138825	I-SETit.14-3-3D-1-1:1:2	192	0,37	0,31
pMON138797	SETit.PIP1-1_1-1:1:1	250	0,33	0,39
pMON140764	I-SETit.Prx17-2-1:1:1	257	0,33	0,41
pMON138786	I-SETit.eEF1g 1-1:1:2	220	0,32	0,29
pMON138818	I-SETit.GAD 4-1:1:2	240	0,32	0,09
pMON138802	I-SETit.40S-7S-2_3-1:1:1	206	0,3	0,22
pMON138801	I-SETit.TubA2 2-1:1:1	263	0,29	0,2
pMON138793	I-SETit.PIP1_1_2-1:1:1	249	0,24	0,33
pMON138807	I-SETit.40S-7S-2 4-1:1:1	207	0,24	0,3
pMON138800	I-SETit.40S-7S-3_3-1:1:2	210	0,22	0,11
pMON138795	I-SETit.PIP2-5 3-1:1:2	256	0,21	0,19
pMON138790	I-SETit.PIP2-5 2-1:1:2	255	0,19	0,18
pMON138796	I-SETit.PIP1-1_3-1:1:2	251	0,18	0,19
pMON138810	I-SETit.40S-7S-3 2-1:1:2	209	0,17	0,16
pMON138787	I-SETit.eEF1g_4-1:1:3	221	0,13	0,17
pMON138784	I-SETit.PIP2-2_2-1:1:2	253	0,1	0,15
pMON138798	I-SETit.40S-7S-2 2-1:1:1	205	0,09	0,09
Sin ADN			0	0
pMON138842	I-SETit.eIF5A1-1-1:1:1	222		
pMON138845	I-SETit.14-3-3E-4-1:1:2	199		

Como se observó en las células protoplásticas de maíz, muchos de los elementos intrónicos de prueba proporcionaron una mejora de la expresión del transgén en relación con los controles sin intrones. Mejora potenciada de la expresión de GUS, en relación con el elemento intrónico. Se observó I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102) usando los elementos intrónicos, I-SETit.LSm8-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 243), I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 215), I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 224), I-SETit.GRP-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 242), I-SETit.14-3-3D-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 193), I-SETit.14-3-3D-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 194), I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 234), I-SETit.LSm8-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 246), I-SETit.LSm8-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 244), I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 233), I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 225), I-SETit.ASA2-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 216), I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 212), I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 231), I-SETit.14-3-3B-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 184), I-SETit.14-3-3B-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 183), I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 219), I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 180), I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 235), I-SETit.14-3-3C-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 191), I-SETit.TubA3_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 266), I-SETit.40S-7S-1_3-1:1:2 (SEQ ID NO: 203), I-SETit.TubA2_3-1:1:1 (SEQ ID NO: 264), I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 189), I-SETit.Prx3-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 258) e I-SETit.DnaJ_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 218).

15 Ejemplo 15. Ensayo de molécula de terminación de la transcripción en 3' o UTR 3' en protoplastos.

Se aíslan moléculas de terminación de la transcripción en 3' o 3' UTR de panizo (*Setaria italica* (L.) Beauv) y se clonaron en vectores base de plantas usando procedimientos conocidos en la técnica para probar la eficacia de la 3' UTR en la terminación de la transcripción así como en la mejora de la expresión de un transgén.

Las 3' UTR útiles para proporcionar la expresión de un transgén en plantas se identifican basándose en la expresión de marcadores de secuencia expresados (EST) en bibliotecas de ADNc preparadas a partir de ARN mensajero aislado de semilla, flor y otros tejidos obtenidos de panizo (*Setaria italica* (L.) Beauv). Las bibliotecas de ADNc se elaboran a partir de tejidos aislados de *S. italica* usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia a partir de tejido floral, semilla, hoja y raíz. Los ADNc resultantes se secuencian usando diversos procedimientos de secuenciación conocidos en la técnica. Los EST resultantes se ensamblan en conglomerados usando software bioinformático tal como *clc_ref_assemble_complete* versión 2.01.37139 (CLC bio USA, Cambridge, Massachusetts 02142). Se determinó la abundancia de transcritos de cada conglomerado contando el número de lecturas de ADNc para cada conglomerado.

Las 3' UTR identificadas pueden estar compuestas por secuencias procedentes de una secuencia de ADNc así como secuencias procedentes de ADN genómico. La secuencia de ADNc se usa para diseñar cebadores, que se usan a continuación con bibliotecas GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) construidas siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 3' de la secuencia de ADN genómico correspondiente para proporcionar una secuencia de terminación más larga. El análisis de la abundancia relativa del transcrito mediante recuentos directos o recuentos normalizados de lecturas de secuencia observadas para cada biblioteca de tejidos se puede usar para inferir propiedades acerca de patrones de expresión. Por ejemplo, algunas 3' UTR pueden encontrarse en transcritos que se observan en mayor abundancia en el tejido de la raíz a diferencia de la hoja. Esto sugiere que el transcrito está muy expresado en la raíz y que las propiedades de expresión de la raíz pueden ser atribuibles a la regulación de la transcripción del promotor, el líder, los intrones o la 3' UTR. Pruebas empíricas de 3' UTR identificadas por las propiedades de expresión dentro de órganos, tejidos o tipos celulares específicos pueden dar lugar a la identificación de 3' UTR que mejoran la expresión en esos órganos, tejidos o tipos celulares específicos.

Se presentan secuencias 3' UTR aisladas de *S. italica* como las SEQ ID NO: 268 a 276 y las SEQ ID NO: 779 a 924. La tabla 23 a continuación presenta 3' UTR identificadas como útiles para el control de la expresión y la potenciación de la expresión en raíz o expresión constitutiva.

Tabla 23. Elementos de terminación de la transcripción o 3' UTR procedentes de *S. italica*.

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
T-SETit.Act1-1:1:1	268	Actina 1
T-SETit.Act8-1:1:1	269	Actina 8
T-SETit.Ams1-1:1:1	270	S-adenosilmetionina sintetasa 1
T-SETit.Ctpt-1:1:2	271	Translocador de triosa fosfato/fosfato, precursor de cloroplasto
T-SETit.Fba-1:1:1	272	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Fnr-1:1:1	273	Ferredoxina-NADP+ reductasa
T-SETit.Mes2-1:1:1	274	Metionina sintasa 2
T-SETit.Ntr-1:1:1	275	Transportador de nitrato
T-SETit.Sus2-1:1:1	276	Sacarosa sintasa 2
T-SETit.36384-1:1:1	779	Conglomerado 36384
T-SETit.37025-1:1:1	780	Conglomerado 37025
T-SETit.37470-1:1:1	781	Conglomerado 37470
T-SETit.Ams2-1:1:1	782	S-adenosilmetionina sintetasa 2
T-SETit.Atps-1:1:1	783	Subunidad gamma de ATP sintasa
T-SETit.Cab-1:1:1	784	Proteína de unión a clorofila a/b
T-SETit.Cab 1-1:1:1	785	Proteína de unión a clorofila a/b
T-SETit.Ctpt-1:1:1	786	Translocador de triosa fosfato/fosfato, precursor de cloroplasto
T-SETit.DnaK-1:1:1	787	Proteína de choque térmico
T-SETit.Fba-1:1:2	788	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Fba-1:1:3	789	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Fba-1:1:4	790	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Gapdh-1:1:1	791	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
T-SETit.MES2_nno-1:1:1	792	Metionina sintasa 2
T-SETit.Oep-1:1:1	793	Proteína generadora de oxígeno de 33 kDa
T-SETit.Pea-1:1:1	794	ATPasa exportadora de protones
T-SETit.Pod-1:1:1	795	Piruvato ortofosfato dicinasa
T-SETit.Ppc-1:1:1	796	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
T-SETit.Psi-K-1:1:1	797	Subunidad del centro de reacción del fotosistema I
T-SETit.Psi-L-1:1:1	798	Subunidad del centro de reacción del fotosistema I
T-SETit.Rfe-s-1:1:1	799	Rieske Fe-S
T-SETit.TubA-1:1:1	800	Tubulina A

(continuación)

Anotación	SEQ ID NO:	Descripción
T-contig00388	801	3' UTR de raíz
T-contig05482	802	3' UTR de raíz
T-contig08555	803	3' UTR de raíz
T-contig08556	804	3' UTR de raíz
T-contig09485	805	3' UTR de raíz
T-contig13749	806	3' UTR de raíz
T-contig16157	807	3' UTR de raíz
T-contig18936	808	3' UTR de raíz
T-contig18994	809	3' UTR de raíz
T-contig21387	810	3' UTR de raíz
T-contig23385	811	3' UTR de raíz
T-contig24188	812	3' UTR de raíz
T-contig24188	813	3' UTR de raíz
T-contig24832	814	3' UTR de raíz
T-contig24890	815	3' UTR de raíz
T-contig24916	816	3' UTR de raíz
T-contig25097	817	3' UTR de raíz
T-contig25509	818	3' UTR de raíz
T-contig25584	819	3' UTR de raíz
T-contig26532	820	3' UTR de raíz
T-contig28013	821	3' UTR de raíz
T-contig29922	822	3' UTR de raíz
T-contig34261	823	3' UTR de raíz
T-contig34311	824	3' UTR de raíz
T-contig34749	825	3' UTR de raíz
T-contig35408	826	3' UTR de raíz
T-contig35550	827	3' UTR de raíz
T-contig35785	828	3' UTR de raíz
T-contig35943	829	3' UTR de raíz
T-contig36050	830	3' UTR de raíz
T-contig36266	831	3' UTR de raíz
T-contig36378	832	3' UTR de raíz
T-contig36502	833	3' UTR de raíz
T-contig36728	834	3' UTR de raíz
T-contig36811	835	3' UTR de raíz
T-contig36883	836	3' UTR de raíz
T-contig37316	837	3' UTR de raíz
T-contig37476	838	3' UTR de raíz
T-contig37510	839	3' UTR de raíz
T-contig37704	840	3' UTR de raíz
T-contig37883	841	3' UTR de raíz
T-contig37920	842	3' UTR de raíz
T-contig37959	843	3' UTR de raíz
T-contig37976	844	3' UTR de raíz
T-contig38003	845	3' UTR de raíz
T-SETIT-28JUL09-CLUS3016 12	846	3' UTR de raíz
T-10SETIT-28JUL09-CLUS1332_ 4	847	3' UTR constitutivo
T-17SETIT-28JUL09-CLUS1910 15	848	3' UTR constitutivo
T-7SETIT-28JUL09-CLUS2844 11	849	3' UTR constitutivo
T-contig00006	850	3' UTR constitutivo
T-contig00142	851	3' UTR constitutivo
T-contig00191	852	3' UTR constitutivo
T-contig00205	853	3' UTR constitutivo
T-contig00242	854	3' UTR constitutivo
T-contig00263	855	3' UTR constitutivo
T-contig01883	856	3' UTR constitutivo
T-contig02157	857	3' UTR constitutivo
T-contig02856	858	3' UTR constitutivo
T-contig02883	859	3' UTR constitutivo
T-contig04253	860	3' UTR constitutivo

T-contig05397	861	3' UTR constitutivo
T-contig05720	862	3' UTR constitutivo
T-contig 10626	863	3' UTR constitutivo
T-contig10874	864	3' UTR constitutivo
T-contig 11193	865	3' UTR constitutivo
T-contig14970	866	3' UTR constitutivo
T-contig26892	867	3' UTR constitutivo
T-contig32186	868	3' UTR constitutivo
T-contig32187	869	3' UTR constitutivo
T-contig33439	870	3' UTR constitutivo
T-contig33682	871	3' UTR constitutivo
T-contig34270	872	3' UTR constitutivo
T-contig34378	873	3' UTR constitutivo
T-contig35132	874	3' UTR constitutivo
T-contig35270	875	3' UTR constitutivo
T-contig35388	876	3' UTR constitutivo
T-contig35412	877	3' UTR constitutivo
T-contig35488	878	3' UTR constitutivo
T-contig35982	879	3' UTR constitutivo
T-contig36384	880	3' UTR constitutivo
T-contig36588	881	3' UTR constitutivo
T-contig36702	882	3' UTR constitutivo
T-contig36980	883	3' UTR constitutivo
T-contig36992	884	3' UTR constitutivo
T-contig36993	885	3' UTR constitutivo
T-contig37025	886	3' UTR constitutivo
T-contig37162	887	3' UTR constitutivo
T-contig37351	888	3' UTR constitutivo
T-contig37386	889	3' UTR constitutivo
T-contig37448	890	3' UTR constitutivo
T-contig37456	891	3' UTR constitutivo
T-contig37638	892	3' UTR constitutivo
T-contig37732	893	3' UTR constitutivo
T-contig37897	894	3' UTR constitutivo
T-contig37927	895	3' UTR constitutivo
T-contig37962	896	3' UTR constitutivo
T-contig37980	897	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS11107_1	898	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS11705_1	899	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS11899_1	900	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS12698_2	901	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS13580_1	902	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS 1404_1	903	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS14743_1	904	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS181186_1	905	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS19095_1	906	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_13	907	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_14	908	3' UTR constitutivo
T-SETIT28JUL09CLUS1910_16	909	3' UTR constitutivo
T-SETIT28JUL09CLUS1910_17	910	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_18	911	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_19	912	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS2157_4	913	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS2166_1	914	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS243_3	915	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS3485_1	916	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS364_1	917	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS36567_1	918	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS42130_1	919	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS52844_1	920	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS7004_1	921	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS83_23	922	3' UTR constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS937_1	923	3' UTR constitutivo

T-SETIT-28JUL09-CLUS95524_1	924	3' UTR constitutivo
-----------------------------	-----	---------------------

Los 3' UTR de la presente invención, presentadas como las SEQ ID NO: 268 a 276 y las SEQ ID NO: 779 a 924 se prueban en ensayos de protoplastos transitorios. Se usa un promotor constitutivo o de otro tipo para dirigir la expresión de un transgén tal como GUS. Se construyen vectores de plantas usando procedimientos conocidos en la técnica en los que se usa un casete transgénico para probar las propiedades de la 3' UTR, así como proporcionar un transcrito que se puede analizar para entender la eficacia de la 3' UTR en el control de la expresión del transgén y el procesamiento del transcrito resultante.

Para el ensayo transitorio de la eficacia de la 3' UTR de prueba, se construye un vector de planta base usando procedimientos conocidos en la técnica. La 3' UTR se clona en un vector de planta base que comprende un primer casete transgénico para probar la 3' UTR que comprende, un promotor constitutivo tal como el promotor del virus del mosaico de la coliflor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1114), unido operativamente a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente a una secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS) que posea un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091) o sin intrón (GUS-1, SEQ ID NO: 1090), unido operativamente a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRTu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088) o la región de terminación 3' del gen de la proteína de transferencia de lípidos del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 1089); un segundo casete de selección del transgén usado para la selección de las células vegetales transformadas que confirió resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el grupo de elementos reguladores de la transcripción de actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098) o, como alternativa, el antibiótico kanamicina (dirigido por el grupo de elementos reguladores de la transcripción de actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098) y una región del extremo izquierdo de *A. tumefaciens*.

Se realizan varias observaciones experimentales para caracterizar la 3' UTR en el ensayo de protoplastos. Por ejemplo, el nivel de expresión se determina usando tinción de GUS como se ha descrito en ejemplos anteriores para evaluar la cantidad de proteína expresada y se normaliza usando procedimientos conocidos en la técnica para establecer una comparación en los niveles de expresión de proteína de la 3' UTR de prueba con respecto a control de T-AGRTu.nos. El ARN total se extrae y se explora en transferencias de Northern con sondas específicas para la secuencia codificante de GUS para evaluar el tamaño o tamaños de los transcritos producidos en las células protoplásticas para determinar la eficacia de la 3' UTR en la terminación de la transcripción. Como alternativa, la secuencia 3' de la 3' UTR puede usarse para cebar reacciones de amplificación a partir de ARN transcrito inverso para detectar transcripciones en las que se ha producido una translectura más allá de la 3' UTR. El ARN total explorado en transferencias de Northern también puede revelar la abundancia relativa de transcrito en comparación con el control de T-AGRTu.nos.

Ejemplo 16. Ensayo de secuencias de terminación de la transcripción o 3' UTR en plantas estables.

Las 3' UTR, presentadas como las SEQ ID NO: 268 a 276 y las SEQ ID NO: 779 a 924 se prueban en plantas de maíz transformadas de forma estable. Para un ensayo de planta estable de la 3' UTR, se construye un vector de transformación de plantas de expresión de GUS usando procedimientos conocidos en la técnica similares a las construcciones descritas en los ejemplos anteriores. La 3' UTR se clona en un vector de planta base que comprende un primer casete transgénico para probar la 3' UTR que comprende, un promotor constitutivo tal como el promotor del virus del mosaico de la coliflor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1114), o, como alternativa, un promotor de la raíz tal como el promotor de la proteína de transferencia de lípidos, P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO: 1093), unido operativamente en 5' al líder, L-Os.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 1094), unido operativamente a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente a una secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS) que posea un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091) o sin intrón (GUS-1, SEQ ID NO: 1090), unido operativamente a una región de terminación 3' de prueba; un segundo casete de selección del transgén usado para la selección de las células vegetales transformadas que confirió resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el grupo de elementos reguladores de la transcripción de actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098) o, como alternativa, el antibiótico kanamicina (dirigido por el grupo de elementos reguladores de la transcripción de actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098) y una región del extremo izquierdo de *A. tumefaciens*.

Los plásmidos resultantes se usan para transformar plantas de maíz. Los transformantes de copia única o bajo número de copias se seleccionan para comparación con plantas transformadas de copia única o bajo número de copias, transformadas con un vector de transformación de plantas idéntico al vector de prueba pero que comprende una 3' UTR bien caracterizada, tal como la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRTu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088) unida operativamente al transgén de GUS.

Las plantas de maíz se transforman como se ha descrito anteriormente o mediante procedimientos de transformación mediados por *Agrobacterium* conocidos en la técnica. Se recoge tejido en diferentes puntos temporales de desarrollo y de diferentes órganos y se analiza la actividad de GUS para evaluar la cantidad de proteína expresada en cada tejido en diferentes ventanas de tiempo de desarrollo y se compara con la expresión de GUS en plantas transformadas de control. Se extrae ARN total de los diferentes tejidos de interés y se explora en transferencias de Northern con sondas específicas para la secuencia codificante de GUS para evaluar el tamaño o tamaños de los transcritos producidos dentro de cada uno de los tejidos seleccionados para determinar la eficacia de

la 3' UTR en la terminación de la transcripción y la abundancia relativa de mensaje en cada tejido seleccionado. Como alternativa, la secuencia 3' de la 3' UTR puede usarse para cebar reacciones de amplificación de ARN transcrito inverso para detectar transcritos en las que se ha producido una translectura más allá de la 3' UTR o evaluar la cantidad de transcrito expresada en cada tejido. Las 3' UTR más útiles y eficaces se seleccionan para su uso en casetes transgénicos en los que se expresan genes de importancia agronómica.

Ejemplo 17: Análisis de la mejora de la actividad de GUS mediada por 3' UTR en plantas de maíz transgénicas.

Se construyen vectores binarios de plantas usando procedimientos conocidos en la técnica similares a los descritos en el ejemplo anterior y se usan para transformar plantas de maíz para probar la eficacia de las 3' UTR seleccionadas.

Se usan vectores de transformación de plantas para transformar plantas de maíz para probar la eficacia en el control de la expresión del transgén de GUS, cuando es dirigido por un promotor constitutivo, (P-FMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1115) + L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1114)) o un promotor de raíz mejorado, ((E-CaMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1116) + P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO: 1093) + L-Os.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 1094)). Los vectores de expresión en plantas resultantes contienen una región del extremo derecho de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete transgénico para probar la 3' UTR que comprende un promotor constitutivo, (P-FMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1115) + L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1114)) o un promotor de raíz mejorado, ((E-CaMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1116) + P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO: 1093) + L-Os.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 1094)), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de β -glucuronidasa (GUS) que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091) unido operativamente a la 3' UTR de prueba; un segundo casete de selección transgénico usado para la selección de células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (dirigido por el promotor de actina 1 del arroz) y una región del extremo izquierdo de *A. tumefaciens*. La tabla 24 a continuación muestra las construcciones de prueba y el promotor correspondiente y 3' UTR.

Tabla 24. Terminación de la transcripción o construcciones de prueba de 3' UTR en las que GUS es dirigido por un promotor constitutivo o un promotor de raíz mejorado.

3' UTR de prueba	Construcciones constitutivas P-FMV. 35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1115) L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1114)	Construcciones de raíz mejoradas E-CaMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1116) P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO: 1093) L-Os.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 1094)
T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275)	pMON126964	pMON126965
T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276)	pMON126966	pMON126967
T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271)	pMON126968	pMON126969
T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273)	pMON126974	pMON126975
T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274)	pMON126976	pMON126977
T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272)	pMON126978	pMON126979
T-SETit.Act8-1:1:1 (SEQ ID NO: 269)	pMON127033	
T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268)	pMON127035	
T-SETit.Ams1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270)	pMON127041	

Las plantas de maíz se transforman usando procedimientos mediados por *Agrobacterium* conocidos en la técnica y como se describen en los ejemplos anteriores. Las plantas de maíz transformadas se analizan para determinar la actividad de GUS como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Las tablas 25 y 26 muestran el nivel promedio de expresión de GUS observado en diversos tejidos aislados de las plantas transformadas en las que el promotor constitutivo, ((P-FMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1115) + L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1114)), condujo la expresión del transgén de GUS. Las tablas 27 y 28 muestran el nivel promedio de expresión de GUS observado en tejidos aislados de las plantas transformadas en las que el promotor de raíz mejorado, ((E-CaMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1116) + P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO: 1093) + L-Os.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 1094)), condujo la expresión del transgén de GUS. La mejora de la expresión impartida por la 3' UTR se infiere mediante la comparación relativa entre las construcciones transformadas que comprenden cada UTR y el promotor específico.

Tabla 25. Expresión promedio de GUS R₀ de un promotor constitutivo que dirige GUS con diferentes 3' UTR.

Construcción	Anotación 3' UTR	Raíz V3	Raíz V7	Raíz VT	Hoja V3	Hoja V7	Hoja VT
pMON126964	T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275)	45,54	136,70	103,51	112,24	151,17	304,15
pMON126966	T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276)	12,01	nd	123,25	33,30	140,51	100,88
pMON126968	T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271)	9,76	nd	108,38	231,03	417,04	157,53
pMON126974	T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273)	7,74	nd	53,30	163,74	357,60	456,63
pMON126976	T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274)	nd	nd	454,44	235,62	268,63	235,73
pMON126978	T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272)	nd	158,85	45,89	60,97	250,87	121,41
pMON127033	T-SETit.Act8-1:1:1 (SEQ ID NO: 269)	nd	nd	203,77	129,06	240,13	460,74
pMON127035	T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268)	117,02	174,21	557,50	412,92	511,88	531,34
pMON127041	T-SETit.Ams1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270)	842,04	564,84	246,90	986,33	225,68	279,58

La expresión promedio del gen de GUS se efectuó mediante diferentes 3' UTR. La expresión de GUS conducida por el promotor constitutivo pareció verse afectada por el uso de diferentes 3' UTR, en particular con respecto a la expresión en hojas. Se pudo ver una mejora de la expresión en hojas en la etapa V3 y V7 cuando la 3' UTR, T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271) se usó en combinación con el promotor constitutivo. Se proporcionó una mejora para las 3 etapas de la hoja al combinar el promotor constitutivo con las 3' UTR, T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274), T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268) y T-SETit.Ams1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270). Se observó un aumento de la expresión en la raíz usando el promotor constitutivo a lo largo de las 3 etapas usando la 3' UTR, T-SETit.Ams1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270) y en la etapa VT usando las 3' UTR, T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274), T-SETit.Act8-1:1:1 (SEQ ID NO: 269) y T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268).

Tabla 26. Expresión promedio de GUS R₀ de un promotor constitutivo que dirige GUS con diferentes 3' UTR.

Construcción	Anotación 3' UTR	Antera VT	Estigma VT	Embrión 21 DAP	Endospermo 21 DAP
pMON126964	T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275)	140,38	96,86	36,85	139,47
pMON126966	T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276)	166,05	110,71	275,98	223,52
pMON126968	T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271)	219,71	101,88	72,49	235,36
pMON126974	T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273)	350,21	419,08	107,48	243,22
pMON126976	T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274)	401,38	370,21	174,26	366,92
pMON126978	T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272)	41,62	59,81	115,59	168,81
pMON127033	T-SETit.Act8-1:1:1 (SEQ ID NO: 269)	324,04	435,63	133,10	262,52
pMON127035	T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268)	408,61	707,00	119,39	419,52
pMON127041	T-SETit.Ams1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270)	346,60	246,92	134,79	251,23

Se pudo observar un aumento de la expresión de GUS en la antera y el polen cuando se usa un promotor constitutivo para las 3' UTR, T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273), T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274), T-SETit.Act8-1:1:1 (SEQ ID NO: 269), T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268) y T-SETit.Ams1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270). Se pudo observar un aumento de la expresión de GUS en el endospermo cuando se usa un promotor constitutivo para la 3' UTR, T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276). Se pudo observar un aumento de la expresión de GUS en el embrión cuando se usa un promotor constitutivo en la mayoría de las 3' UTR en relación con el expresor más bajo, T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275). La mayor cantidad de mejora en el embrión se observó usando las 3' UTR, T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274) y T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268).

La translectura se evaluó usando procedimientos de PCR conocidos en la técnica. Las 3' UTR que demostraron alguna translectura en el ensayo fueron T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275), T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276), T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271), T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274) y T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268). Las 3' UTR en las que no se observó translectura fueron T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273), T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272), T-SETit.Act8-1:1:1 (SEQ ID NO: 269) y T-SETit.Ams1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270).

Tabla 27. Expresión promedio de GUS R₀ de un promotor de raíz mejorado que dirige GUS con diferentes 3' UTR.

Construcción	Anotación 3' UTR	Raíz V3	Raíz V7	Raíz VT	Hoja V3	Hoja V7	Hoja VT
pMON126965	T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275)	7,86	11,39	8,34	0,00	5,60	8,89
pMON126967	T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276)	67,45	44,80	8,98	0,00	0,00	0,00
pMON126969	T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271)	35,07	28,96	6,28	7,44	5,07	0,00
pMON126975	T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273)	45,53	12,99	10,67	81,88	0,00	0,00
pMON126977	T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274)	16,64	50,03	23,55	0,00	20,47	0,00
pMON126979	T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272)	30,95	19,79	14,22	0,00	7,47	0,00

Usando un promotor de raíz mejorado, se observó una mejora en la raíz en la etapa V3 y V7 usando la 3' UTR, T-SETitSus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276). También se pudo observar una ligera mejora de la expresión en raíz cuando se usan las 3' UTR, T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271) (etapa V3 y V7), T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273) (etapa V3) y T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272) (etapa V3). Se observó una mejora de la expresión en hojas cuando se usó el promotor de raíz mejorado en combinación con T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273).

Tabla 28. Expresión promedio de GUS R₀ de un promotor de raíz mejorado que dirige GUS con diferentes 3' UTR.

Construcción	Anotación 3' UTR	Antera VT	Estigma VT	Embrión 21 DAP	Endospermo 21 DAP
pMON126965	T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275)	6,59	5,16	0,00	0,00
pMON126967	T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276)	12,24	0,00	115,97	21,68
pMON126969	T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271)	0,00	0,00	7,20	10,77
pMON126975	T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273)	5,71	12,57	7,60	0,00
pMON126977	T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274)	7,28	0,00	0,00	5,18
pMON126979	T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272)	11,25	0,00	0,00	8,38

Se observó una mejora de la expresión en el embrión para la 3' UTR, T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276) cuando se combinó con el promotor de raíz mejorado. Cada uno de los elementos 3' UTR presentados anteriormente tuvo un efecto sobre la expresión de GUS cuando se combinaron en unión operativa con éter, un promotor constitutivo o un promotor de raíz mejorado.

Ejemplo 18. Identificación y ensayo de péptidos de tránsito de cloroplastos (CTP).

Es bien sabido que las células de los organismos eucariotas y, más en particular, células vegetales, contienen distintos compartimentos subcelulares u orgánulos, delimitados por sistemas de membranas característicos y que realizan funciones especializadas dentro de la célula. En las células foliares fotosintéticas de plantas superiores, los orgánulos más conspicuos son los cloroplastos, que existen de forma semiautónoma dentro de la célula, que contienen su propio sistema genético y maquinaria de síntesis de proteínas, pero que se apoyan en una cooperación estrecha con el sistema nucleocitoplasmático en su desarrollo y actividades biosintéticas.

La mayoría de las proteínas del cloroplasto están codificadas en el ADN nuclear y son productos de la síntesis de proteínas en ribosomas citoplasmáticos, muchas como precursores solubles de mayor peso molecular. Estos precursores se translocan después a través de una o ambas membranas de la envoltura del plastidio, se procesan y se ensamblan en su compartimento de orgánulo final o complejo holoenzimático. Los experimentos de reconstitución *in vitro* que usan cloroplastos aislados, han demostrado que la captación y el procesamiento de más de cien precursores sintetizados en el citoplasma, de codificación nuclear, por cloroplastos se producen mediante un mecanismo postraducciona dependiente de la energía.

La más exhaustivamente caracterizada de estas proteínas de cloroplasto de codificación nuclear es la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) carboxilasa. Este polipéptido se sintetiza en ribosomas citoplasmáticos libres como un precursor de 20.000 daltons que contiene una extensión amino terminal o péptido de tránsito de aproximadamente 5-6.000 daltons. Durante o inmediatamente después de la importación del precursor al cloroplasto, el péptido de tránsito se elimina proteolíticamente en dos etapas mediante una proteasa soluble, que produce un polipéptido de subunidad pequeña maduro de 15.000 daltons. A continuación, este polipéptido se ensambla con una subunidad grande endógena en la holoenzima funcional RuBP carboxilasa.

Estas diferentes propiedades de los péptidos de tránsito están en la base de los ADN recombinantes, más particularmente vectores recombinantes que incluyen una secuencia de ADN que codifica una proteína o un polipéptido determinado, en particular una proteína extraña, que se busca introducir y procesar en cloroplastos, así como los procedimientos para la introducción de dicho polipéptido o proteína extraños en los cloroplastos, por ejemplo, en las membranas tilacoides o, preferentemente, en el estroma de los mismos.

Los péptidos de tránsito de cloroplasto (CTP) se aíslan de *S. italica* en función de un análisis de secuencias de conglomerados de EST y homología con moléculas diana de plastidios conocidas. Se usan conglomerados de secuencias de EST para deducir la secuencia codificante de moléculas proteicas dirigidas al cloroplasto. Un fragmento procedente del extremo 5' de la secuencia codificante de la molécula dirigida al cloroplasto deducida se clona usando procedimientos conocidos en la técnica para producir una molécula quimérica en la que una secuencia codificante que codifica una molécula no dirigida al cloroplasto se fusiona en el marco en el extremo 5' con un fragmento de ADN que codifica la secuencia del posible péptido de tránsito y se clona en un vector de expresión en planta para determinar la capacidad y la eficiencia del posible CTP para causar la importación de la molécula quimérica en el cloroplasto y el procesamiento posterior de la secuencia del péptido de tránsito en la proteína procesada madura.

Se comparan los conglomerados de secuencias de EST de *S. italica* traducidas con secuencias de ADN que codifican moléculas dirigidas a plastidios conocidas de monocotiledóneas tales como el maíz, el sorgo y el arroz para determinar la integridad de la secuencia codificante del conglomerado y deducir la secuencia potencial de aminoácidos N-terminal que será útil como secuencia codificante del péptido de tránsito. En algunos casos, la parte más cercana a 5' del conglomerado de EST de *S. italica* está ausente. En esas condiciones, se diseña un oligo degenerativo basándose en una alineación de secuencias codificantes de sorgo y arroz, que codifican homólogos de la secuencia de codificación de proteínas de *S. italica* para facilitar la amplificación de la secuencia 5' desconocida.

Se presentan secuencias codificantes de proteínas dirigidas a plastidios útiles en el aislamiento y la clonación de CTP de *S. italica* como las SEQ ID NO: 1034 a 1060. Se presentan secuencias proteicas que representan péptidos dirigidos a plastidios útiles en la identificación de CTP de *S. italica* como 1061 a 1087. Se presentan secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos de tránsito mostrados en la tabla 29 a continuación como las SEQ ID NO: 277 a 284, 289 a 293, 296, 301 a 304 y 307 a 316. Las secuencias proteicas de los péptidos de tránsito codificados se presentan como las SEQ ID NO: 324 a 350.

Se presentan construcciones para su uso en la clonación de los péptidos de tránsito y las secuencias que codifican el péptido de tránsito así como las ID de la secuencia del péptido de tránsito en la tabla 29 a continuación.

Tabla 29. Construcciones de plásmidos para su uso en la clonación de péptidos de tránsito de cloroplasto y secuencias codificantes de proteínas y nucleótidos asociadas.

Construcción	Anotación	Proteína SEQ ID NO:	Nucleótido SEQ ID NO:	Descripción
pMON136303	GOI-TS-APX	325	277	Ascorbato peroxidasa
pMON139282	GOI-TS-APX:1:2	325	278	Ascorbato peroxidasa
pMON139283	GOI-TS-APX2:1:1	326	279	Ascorbato peroxidasa
pMON139281	GOI-TS-CNT:1:2	332	280	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
pMON139291	GOI-TS-DHPS:1:2	334	281	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, de cloroplasto
pMON139288	GOI-TS-Fe-SD:1:1	335	282	Hierro-superoxidodismutasas, de cloroplasto
pMON139287	GOI-TS-PPR:1:1	340	283	Proteína que contiene repeticiones de pentatricopéptido, posible
pMON139276	TS-SETitAPG6-1:1:1	324	284	Proteinasa lítica de caseína de tipo proteína de choque térmico B3
pMON139284	TS-SETit.APX3-1:1:1	327	289	Ascorbato peroxidasa
pMON139278	TS-SETit.ASA2-1:1:1	328	290	Subunidad alfa 2 de antranilato sintasa
pMON139285	TS-SETit.CC10-1:1:1	329	291	Subunidad de 10 Kd de chaperonina de cloroplasto
pMON136299	TS-SETit.CHoR1-1:1:1	330	292	Regulador de la homeostasis del calcio
pMON139280	TS-SETit.ClpD-1:1:1	331	293	Subunidad de unión a ATP de proteasa Clp dependiente de ATP
pMON136296	TS-SETit.CR88-1:1:1	333	296	Supuesta proteína de choque térmico

(continuación)

Construcción	Anotación	Proteína SEQ ID NO:	Nucleótido SEQ ID NO:	Descripción
pMON139290	TS-SETit.G-typA- 1:1:1	336	301	Proteína de unión a GTP typA
pMON136301	TS-SETit.HDh- 1:1:1	337	302	Hidrolasa de tipo haloácido deshalogenasa
pMON139289	TS-SETit.IMP- 1:1:1	338	303	Inositol-1-monofosfatasa, posible, de cloroplasto
pMON136297	TS-SETit.MDH- 1:1:1	339	304	Posible NAD-malato deshidrogenasa
pMON136302	TS-SETit.PSPR- 3-1:1:1	341	307	Proteína ribosómica 30S específica de plastidio 3
pMON136291	TS- SETit.RbcS_1- 1:1:1	342	308	Subunidad pequeña de la RUBISCO
pMON136292	TS- SETit.RbcS_2- 1:1:1	343	309	Subunidad pequeña de la RUBISCO
pMON136293	TS- SETit.RbcS_3- 1:1:1	344	310	Subunidad pequeña de la RUBISCO
pMON136294	TS- SETit.RbcS_4- 1:1:1	345	311	Subunidad pequeña de la RUBISCO
pMON139277	TS-SETit.ShkG- 1:1:1	346	312	Precursor de la 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa
pMON139286	TS-SETit.SRP43- 1:1:1	347	313	Proteína de 43 kDa de partícula de reconocimiento de señales, de cloroplasto
pMON139279	TS-SETit.TDh- 1:1:1	348	314	Treonina deshidratasa biosintética, precursor de cloroplasto
pMON136304	TS-SETit.ThR- 1:1:1	349	315	Tiorredoxina
pMON136287	TS-SETit.Wx1- 1:1:1	350	316	Posible sintasa de almidón unida a gránulos

Las secuencias que codifican el péptido de tránsito presentadas como las SEQ ID NO: 325, 326, 332, 334, 335 y 340 se obtienen y se clonan a partir de secuencias de ADN que comprenden un intrón procesable. La construcción de plásmidos pMON136303 está compuesta por la secuencia que codifica el péptido de tránsito, GOI-TS-APX, presentada como la SEQ ID NO: 277, que comprende además el elemento, TS-SETit.APX.ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 286), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.APX-1:1:1 (SEQ ID NO: 318), unido operativamente en 5' al elemento, TS-SETit.APX.ex2-1:1:2 (SEQ ID NO: 287). La construcción de plásmidos pMON139282 está compuesta por la secuencia que codifica el péptido de tránsito, GOI-TS-APX: 1:2, presentada como la SEQ ID NO: 278, que comprende además el elemento, TS-SETit.APX.ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 286), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.A-PX-1:1:2 (SEQ ID NO: 319), unido operativamente en 5' al elemento, TS-SETit.A-PX.ex2-1:1:2 (SEQ ID NO: 287). La construcción de plásmidos pMON139283 está compuesta por la secuencia que codifica el péptido de tránsito, GOI-TS-APX2:1:1, presentada como la SEQ ID NO: 279, que comprende además el elemento, TS-SETitAPX2.ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 285), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.APX.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 317), unido operativamente en 5' al elemento, TS-SETit.APX2.ex2-1:1:1 (SEQ ID NO: 288). La construcción de plásmidos pMON139281 está compuesta por la secuencia que codifica el péptido de tránsito, GOI-TS-CNT:1:2, presentada como la SEQ ID NO: 280, que comprende además el elemento, TS-SETitCNT.ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 294), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.CNT.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 320), unido operativamente en 5' al elemento, TS-SETit.CNT.ex2-1:1:2 (SEQ ID NO: 295). La construcción de plásmidos pMON139291 está compuesta por la secuencia que codifica el péptido de tránsito, GOI-TS-DH-DPS:1:2, presentada como la SEQ ID NO: 281, que comprende además el elemento, TS-SETit.DHDPS.Ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 297), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.DHDPS_1-1:1:1 (SEQ ID NO: 321), unido operativamente en 5' al elemento, TS-SETit.DHDPS.Ex2-1:1:1 (SEQ ID NO: 298). La construcción de plásmidos pMON139288 está compuesta por la secuencia que codifica el péptido de tránsito, GOI-TS-Fe-SD:1:1, presentada como la SEQ ID NO: 282, que comprende además el elemento, TS-SETitFe-SD.ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 299), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.Fe-SD-1:1:1 (SEQ ID NO: 322), unido operativamente en 5' al elemento, TS-SETit.Fe-SD.ex2-1:1:1 (SEQ ID NO: 300). La construcción de plásmidos pMON139287 está compuesta por la secuencia que codifica el péptido de tránsito, GOI-TS-PPR1:1, presentada como la SEQ ID NO: 283, que comprende además el elemento, TS-SETit.PPR.ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 305), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.PPR-1:1:2 (SEQ ID NO: 323), unido operativamente en 5' al elemento, TS-

SETit.PPR.ex2-1:1:2 (SEQ ID NO: 306).

Se prueban secuencias codificantes aisladas que codifican CTP de *S. italica* usando vectores de plantas diseñados para su uso en ensayos de protoplastos transitorios o de plantas de transformación estable. Los fragmentos de ADN que codifican la CTP se clonan en el marco con una secuencia codificante de GUS usando procedimientos conocidos en la técnica. Se construye un vector de transformación de plantas usando procedimientos conocidos en la técnica y tiene una composición similar a los vectores de plantas descritos en los ejemplos anteriores. El casete de expresión usado para probar el CTP comprende un promotor constitutivo tal como el promotor del virus del mosaico de la coliflor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1097), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de GFP en la que el CTP de prueba se fusiona en el marco en el extremo 5' de la secuencia codificante de GFP para permitir la traducción de una molécula quimérica de CTP-GFP, unida operativamente a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). Para la transformación estable de plantas, un segundo casete de selección transgénico usado para la selección de células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (impulsado por el promotor de actina 1 de arroz) se clona adyacente al casete transgénico de prueba de CTP. Los dos casetes transgénicos están flanqueados por una región de extremo derecho y una región de extremo izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens* para permitir la integración estable de ambos casetes transgénicos en el genoma de la célula vegetal.

Para pruebas de ensayo transitorias del CTP, las células protoplásticas se transforman con la construcción de plásmido vegetal que comprende el casete transgénico de prueba de CTP. Las células protoplásticas transformadas se observan usando microscopia y fluorescencia para determinar la cantidad relativa de proteína GFP presente en el cloroplasto y en el citosol. Un CTP eficaz hará que la mayor parte de la fluorescencia de GFP aparezca en el estroma o en el tilacoide del cloroplasto, dependiendo del tipo de CTP elegido. La proteína se aísla y se somete a electroforesis en geles de poliacrilamida y se tiñe usando procedimientos convencionales y se compara con un patrón de proteína GFP no dirigida a plastidio para determinar si se ha producido el procesamiento adecuado del péptido de tránsito.

Para la transformación estable de plantas, las plantas de maíz se transforman como se ha descrito anteriormente usando procedimientos de transformación mediados por *Agrobacterium* conocidos en la técnica. Los tejidos se recogen de los transformantes en desarrollo y se observan microscópicamente con fluorescencia para determinar las cantidades relativas de proteína GFP en el cloroplasto y el citosol. La proteína se aísla y se somete a electroforesis en geles de poliacrilamida y se tiñe usando procedimientos convencionales y se compara con un patrón de proteína GFP no dirigida a plastidio para determinar si se ha producido el procesamiento adecuado del péptido de tránsito.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en:
 - a) una secuencia con al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 270 y que tiene actividad reguladora de genes; y
 - b) una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 270;5 en la que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible heteróloga.
2. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia tiene al menos un 97 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 270.
3. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia tiene al menos un 98 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 270.
4. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la secuencia de ADN comprende otro elemento regulador.
5. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la molécula polinucleotídica transcribible heteróloga comprende un gen de interés agronómico.
6. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la molécula polinucleotídica transcribible heteróloga comprende un gen capaz de proporcionar resistencia a herbicidas en plantas.
7. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la molécula polinucleotídica transcribible comprende un gen capaz de proporcionar control de plagas vegetales en plantas.
8. Una célula vegetal transgénica que comprende una construcción de ADN que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
 - a) una secuencia con al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 270 y que tiene actividad reguladora de genes; y
 - b) una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 270;20 en la que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible heteróloga.
9. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 8, en la que dicha célula vegetal transgénica es una célula de una planta monocotiledónea.
10. La célula vegetal transgénica de la reivindicación 8, en la que dicha célula vegetal transgénica es una célula de una planta dicotiledónea.
11. Una planta transgénica, o parte de la misma, que comprende la molécula de ADN de la reivindicación 1.
12. Una planta descendiente de la planta transgénica de la reivindicación 11, o parte de la misma, en la que la planta descendiente o parte de la misma comprende dicha molécula de ADN.
13. Una semilla transgénica, en la que la semilla comprende la molécula de ADN de la reivindicación 1.

P-SETit.Act8-1:1:5	TGTGCCATACCCGAGTGGCCATTATATAAATGTAAACTTGATTGACGAAATAATTTCAGGC
P-SETit.Act8-1:1:6	-----
P-SETit.Act8-1:1:5	ACAAGCTGGAAAAATATATTAAATTTTTTTCGATCAATCAGGGCATCAGGTACAAAA
P-SETit.Act8-1:1:6	-----
P-SETit.Act8-1:1:5	GCTGGACAGTGTGATCGAAAAGGCAACACCTGGAAATGGGGTGTTCTCGTTGGGTGAG
P-SETit.Act8-1:1:6	-----
P-SETit.Act8-1:1:5	CGCAGCAGGCCCAAAGCCGACCCCAAGCAACATCCAGCGAAGAACCAAGTTGGACTTGGAC
P-SETit.Act8-1:1:6	-----
P-SETit.Act8-1:1:5	CGACCCGATTGGCGGGCGGCACGTACTGATGCTGCGGGGCCCACTAGGCAGATCGGACGG
P-SETit.Act8-1:1:6	-----
P-SETit.Act8-1:1:5	CGGGTGCGTCCCTCCGCGTCGCCCAATCGTGCGGTCCAGTTGTCTCAGCATCTCCAGCTCA
P-SETit.Act8-1:1:6	-----
P-SETit.Act8-1:1:5	TTCCAGCCTCAGCGGCTCTTTGGGGGCCCTCTATTATTCTCTCTCTTTTTCGAC
P-SETit.Act8-1:1:6	-----
P-SETit.Act8-1:1:5	TCGCTCTCATTTTCTCCAATTTCTTTTCTTTGGTCCCGGACCACAGGTACTTCCAGTGG
P-SETit.Act8-1:1:6	-----
P-SETit.Act8-1:1:5	AAGGAATATAATTGTAGTTTCTATTGTGTAATAGCATTTGTCTGTATACACAATAGAC
P-SETit.Act8-1:1:6	-----ATTGTCTGTATACACAATAGAC *****
P-SETit.Act8-1:1:5	ATGAAATACCTTGGTGCCAGGGTTCTCAGCTCTTCTGGTTATGTTGATTCTTGATCC
P-SETit.Act8-1:1:6	ATGAAATACCTTGGTGCCAGGGTTCTCAGCTCTTCTGGTTATGTTGATTCTTGATCC *****

FIG. 1a

```

P-SETit.Act8-1:1:5 AAACCAAGATGCTGAAGTGAATCATAAAATTTCAATCCTTTACAAATTACCCCTAAAGGA
P-SETit.Act8-1:1:6 AAACCAAGATGCTGAAGTGAATCATAAAATTTCAATCCTTTACAAATTACCCCTAAAGGA
*****
P-SETit.Act8-1:1:5 GTTGTTTTCAATTTGCGCTTCAATTAAGTCTTCGCGCTTCAACGGTGTTGTTGGAA
P-SETit.Act8-1:1:6 GTTGTTTTCAATTTGCGCTTCAATTAAGTCTTCGCGCTTCAACGGTGTTGTTGTTGGAA
*****
P-SETit.Act8-1:1:5 GTTAGAGCATTTGGCTTCGTGGCATGGACCTACTTGCAAAATAATTTCTCTCCCAATTAAAA
P-SETit.Act8-1:1:6 GTTAGAGCATTTGGCTTCGTGGCATGGACCTACTTGCAAAATAATTTCTCTCCCAATTAAAA
*****
P-SETit.Act8-1:1:5 GTTTTTTTTGCAAAATAATGCCCTCTTTTGATGCCATCGCCTTTTCTAGCCCCGTGACAACC
P-SETit.Act8-1:1:6 GTTTTTTTTGCAAAATAATGCCCTCTTTTGATGCCATCGCCTTTTCTAGCCCCGTGACAACC
*****
P-SETit.Act8-1:1:5 GGAGTTCAGGAGATGCATAACTGTCTTTTGAGATCCCCCTTTTATTTATTTTATTTGATTG
P-SETit.Act8-1:1:6 GGAGTTCAGGAGATGCATAACTGTCTTTTGAGATCCCCCTTTTATTTATTTTATTTGATTG
*****
P-SETit.Act8-1:1:5 CAAACTAAATTTTAGTTGGCACTAGCCAGGATGGGCTAAATAATTTCTTGAGATGTTGGCCT
P-SETit.Act8-1:1:6 CAAACTAAATTTTAGTTGGCACTAGCCAGGATGGGCTAAATAATTTCTTGAGATGTTGGCCT
*****
P-SETit.Act8-1:1:5 AAATAATTTTCAGAAAATGAAGTGTCTCTCCACGTCTCCATGACAAAAAATACTCCAT
P-SETit.Act8-1:1:6 AAATAATTTTCAGAAAATGAAGTGTCTCTCCACGTCTCCATGACAAAAAATACTCCAT
*****
P-SETit.Act8-1:1:5 GTTGGACTACAGTCTAAAAAAGAACAGAGCTGTAAACATGATGATTAATAAAGAAAGAA
P-SETit.Act8-1:1:6 GTTGGACTACAGTCTAAAAAAGAACAGAGCTGTAAACATGATGATTAATAAAGAAAGAA
*****
P-SETit.Act8-1:1:5 CATTGAGACCTCTGTTTCATGCTGAAATTATACCTTGTTTTCATTCTTGTACCG
P-SETit.Act8-1:1:6 CATTGAGACCTCTGTTTCATGCTGAAATTATACCTTGTTTTCATTCTTGTACCG
*****

```

FIG. 1b

P-SETit.Act8-1:1:5	TGGTCAAAAGGAAATGTTAGATACTAACTGATAAAGTGAATAATAGATGCATATCCTTAAA
P-SETit.Act8-1:1:6	TGGTCAAAAGGAAATGTTAGATACTAACTGATAAAGTGAATAATAGATGCATATCCTTAAA

P-SETit.Act8-1:1:5	AAAGATCTCCATTTGGAAAAAATATGATAAACACGAAATTCGTAGACGCCGACATCTGA
P-SETit.Act8-1:1:6	AAAGATCTCCATTTGGAAAAAATATGATAAACACGAAATTCGTAGACGCCGACATCTGA

P-SETit.Act8-1:1:5	AAATATTCAATTTTGGGGAAAAAATACACGCCCTCGTATTTCAAACCGTATCTGT
P-SETit.Act8-1:1:6	AAATATTCAATTTTGGGGAAAAAATACACGCCCTCGTATTTCAAACCGTATCTGT

P-SETit.Act8-1:1:5	GTCACGGACACGCATCAATCGAGTCCACGTACCCATCCCTTCCCCTCCCCTTCCCC
P-SETit.Act8-1:1:6	GTCACGGACACGCATCAATCGAGTCCACGTACCCATCCCTTCCCCTCCCCTTCCCC

P-SETit.Act8-1:1:5	CCCGCTCTGTATAAACTCCACCCAGTCCTCGGGG
P-SETit.Act8-1:1:6	CCCGCTCTGTATAAACTCCACCCAGTCCTCGGGG

FIG. 1c

P-SETit.Alc1-1:1:1	CAATCATTGCCACTGAAATCCCTGAGTATAACATAGTTCTCACGAAGAAGGCCAAAGTTG
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	AGCCCAAAATTTTCGATAAAGTCGTTACATCTTATTTTCGTACTTATATCATCTTTACAC
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	ACATGATCAATAATTTTTTCTAGCAAAAAGTCATGCTTCCATATACAGTGAAGATA
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	TGGGCAITGGATAAATCCTAGGAACGCAAAAAAATTGACCTTGCTATGGCCACGACT
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	TCTTGATTCTACCAATTTGACGCAATGAAACCTCTCTCAAGAATGGACATAAAATTTTGGC
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	AAAAAAGGTTCAACCCCAAGTATATAACATAACACACGTATCACAATAGTCTACGTTGCTA
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	GCATGATGGGAACAATACATGCTCATAAACCAAAACATCATTTGTTAAAAATTTTGTGTT
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	ACATGTTTGATTCACATGTTGCCGTAAAAATGGTGCTGATGAGCTTAGACGAAGGACTCAT
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	TGCGCTTCCTGTTATCTTGTGCAAAACATCTCAAAAAGTCATTATTCAAATTCATAAAAGTGA
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	ACGATACAACACTTTTAACCGGCGTAATAGTTTAATAGAGGTAGCGTATAGGGTCGGAAT
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----

FIG. 2a

P-SETit.Alc1-1:1:1	ATCATCTTCTTTGTAGCCATAGGCAATGTCGCACCCCAAGAAATTGAATGGAAATATGATACC
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	GTAAAGTTGAGCGCCAGTGCTCTCAATGTTGTTGTGCACCGATGAAAATTGGTTCCCTGAGTAT
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	ATATGAAAAACAAAGAGTCTAGGTTTTTAATCCGATCCATTGTTACCACACATCCAGAAA
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	CACTATCTTCAACTTTTCATAGAAATATTATGCAAAAGCAGGAAGAAAACTTCCTATGG
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	ATCGATATAGATGGCCCTACAATAATGTATCTGTAGACAAGGTAGAAATACATTCAAAATATG
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	TCAAAAGTAGAATCTTGGGAAACTACAAATGTGCACAAAGCAGCGGTCTCCCACTTTGAGC
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	GACTTTCACCTTTAGAGAGATAGCTCTAAACATATGCATGCGTAGATCTGGTGCAATATAT
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	CCACACCGATTGCAAAACGGATTCCACGCAACCACAAACACCTTGTGCGTGACT
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	TACAATACTGACTTAATCTAGGTTCTTGTGTATTGGCTCATTTACTTGATAACTTCT
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----
P-SETit.Alc1-1:1:1	TCTAGAACTAGTGCGTTACCTCTATCATCCATGAGGATTGGCTCATGGAACAAATCCTAT
P-SETit.Alc1-1:1:2	-----CATCCATGAGGATTGGCTCATGGAACAAATCCTAT

FIG. 2b

P-SETit.Alc1-1:1:1	CCGAGTCAGATGAACAAATGAAGCTCAAAAATGATTTGGATCCACATCAGCAAAATCACAGCT
P-SETit.Alc1-1:1:2	CCGAGTCAGATGAACAAATGAAGCTCAAAAATGATTTGGATCCACATCAGCAAAATCACAGCT

P-SETit.Alc1-1:1:1	TTACAACCAACTTTAACAAGTGAACACATATTTTGTGGCTAAGACTTTCACGTGTT
P-SETit.Alc1-1:1:2	TTACAACCAACTTTAACAAGTGAACACATATTTTGTGGCTAAGACTTTCACGTGTT

P-SETit.Alc1-1:1:1	TAAAGGTGAACCGACCATGATGTTGTCAAAAGACAATACCAACAGAAAGACACTTTT
P-SETit.Alc1-1:1:2	TAAAGGTGAACCGACCATGATGTTGTCAAAAGACAATACCAACAGAAAGACACTTTT

P-SETit.Alc1-1:1:1	TTGCTTGTACAACGGCAAGTTGCTTTGCCAACACATACATTACAACACAAGGGTATTAT
P-SETit.Alc1-1:1:2	TTGCTTGTACAACGGCAAGTTGCTTTGCCAACACATACATTACAACACAAGGGTATTAT

P-SETit.Alc1-1:1:1	CACTAAATGCCAAAATTGACTAGATACCATGTCATCTCCAGTTTATCAAGCTAGCGATT
P-SETit.Alc1-1:1:2	CACTAAATGCCAAAATTGACTAGATACCATGTCATCTCCAGTTTATCAAGCTAGCGATT

P-SETit.Alc1-1:1:1	GCAAGGCACAAAGCAAAAATCTTGCTAAAGCTACATGAGCTCTCATGCCTATAAATACGCC
P-SETit.Alc1-1:1:2	GCAAGGCACAAAGCAAAAATCTTGCTAAAGCTACATGAGCTCTCATGCCTATAAATACGCC

P-SETit.Alc1-1:1:1	CCAAAATGTTGTAGGT
P-SETit.Alc1-1:1:2	CCAAAATGTTGTAGGT

FIG. 2c

P-SETit.Cys1:1:2 P-SETit.Cys1:1:3	GGTGGTTAATCTTTATGGGTAGTTTAGTGTGGCTTGCAACTTTATCATGAAAAATAGGT -----
P-SETit.Cys1:1:2 P-SETit.Cys1:1:3	TGTATAGTCACTTGTGGCTTGCAACTTTATCATGAAGGAAAAGTTGTATAGTCAITGTGTT -----
P-SETit.Cys1:1:2 P-SETit.Cys1:1:3	CAAAAGTTTGCAATCTCTAACCCTGCATGTACTAAATCGTAGACACTGAAGCTCCTCAAAAG -----
P-SETit.Cys1:1:2 P-SETit.Cys1:1:3	TGGAATTCCTGGATTTCTCTGAAGAACCCTTCGGAGTTTGAGGAGATTTTGTAGTTGATCC -----
P-SETit.Cys1:1:2 P-SETit.Cys1:1:3	CCTGTGAAGCCGGACCTTCGGACAACACTAACCTTTTACAGATCAAGGCAAGCCCCGGT -----
P-SETit.Cys1:1:2 P-SETit.Cys1:1:3	GCATCTATACCTACCTACTTTGGAGTTATTATTTCAATGTGTTCAATTGTTGGTTATTTTC -----
P-SETit.Cys1:1:2 P-SETit.Cys1:1:3	CGTATGAATGCATTAAGTCTAGGAGTTGATTGAAACCTATTCTTGTGCAATGATCCTACCT -----
P-SETit.Cys1:1:2 P-SETit.Cys1:1:3	GATTTAGAGGACATCTTTGCCACTTGTTCACTAATTAGTAACCTATCCTATGCTTAGCAAT -----
P-SETit.Cys1:1:2 P-SETit.Cys1:1:3	GCTTAGATACTTCAAGCAACTTGGAATTGCTTAGCTCTAAGGAAAATTTTGGTCAATACATG -----
P-SETit.Cys1:1:2 P-SETit.Cys1:1:3	TTAGTTAAGGAAAAATAGCCTGGAAATTGGAAATGCAGACAGAAAGCTAGAGATGGTAGTT -----
P-SETit.Cys1:1:2 P-SETit.Cys1:1:3	CTGTTTGCTAAGTTAATTGGTTAAGCCCGATCGTTGTCTTAACCTTTGATCAAGTGAG -----

FIG. 3a

P-SETit.Cys-1:1:2	TTCTACCTGGTTGCTTACTGGGTATGGGACCAGTAAAGCCCGGTAGTTAGTTGGCTCTT
P-SETit.Cys-1:1:3	-----
P-SETit.Cys-1:1:2	TGATCGGGAATATTTTCGTACCCGTGCTTGACGTGCTGGAGAAATGGTAGGGGCATAGCCTG
P-SETit.Cys-1:1:3	-----
P-SETit.Cys-1:1:2	AAACTCACATGGAGATCAGGCCAGACGTGGGGTCCCATGTGGGGTGCGTCCCTGGGTTTCG
P-SETit.Cys-1:1:3	-----
P-SETit.Cys-1:1:2	GGTAGTCAATGTTCCCAATTTTGGGTACGGCTAATAGAAAAGTCAATTATATGCAACCTAG
P-SETit.Cys-1:1:3	-----
P-SETit.Cys-1:1:2	ACAGTTGTACATAGCTGGTGGTTGGGTATCTCCTGCAGGATGTAAATTGATCCGGATCGC
P-SETit.Cys-1:1:3	-----
P-SETit.Cys-1:1:2	CGCAATTCTCGGATATGAATGCACCTTGATCACCGTTAAGCATCATACTGTAATCCAGTTG
P-SETit.Cys-1:1:3	-----
P-SETit.Cys-1:1:2	AAATAAATGTTTTTCCCTAGAAATGAATATGCTGTATGACTTAGTTCCACTGAGTGTCTCAA
P-SETit.Cys-1:1:3	-----
P-SETit.Cys-1:1:2	ATGTTTATTTCATCTAGACTGGTTAGGTAACAACATAAACAATAAAAGAATAAAGTTA
P-SETit.Cys-1:1:3	-----
P-SETit.Cys-1:1:2	AGGTTCCACTTATAGTAAGCCTTTCGCAAAAATGTGAGTCCGCCAGTATACTAAACAGC
P-SETit.Cys-1:1:3	-----
P-SETit.Cys-1:1:2	TATCATTACAGTTTTTGGAAAAAAAACATCTATATTTGGTTAATCGGGTCAGTCTTGCT
P-SETit.Cys-1:1:3	-----GCT

P-SETit.Cys-1:1:2	AAGTACCCCTCGGACTCAGGGGAATCCTTCGTTGCTATTTTCAGAACTACAGCAAGAGTCCG
P-SETit.Cys-1:1:3	AAGTACCCCTCGGACTCAGGGGAATCCTTCGTTGCTATTTTCAGAACTACAGCAAGAGTCCG

FIG. 3b

P-SETit.Cys-1:1:2	CCGAGGGAGAAAGCCCGAAGAAATTAGGGTATTTTACGAGTCTCATAATAACCTAGAAAT
P-SETit.Cys-1:1:3	CCGAGGGAGAAAGCCCGAAGAAATTAGGGTATTTTACGAGTCTCATAATAACCTAGAAAT

P-SETit.Cys-1:1:2	AAAACTCAGATGTTTAACTTTCACCTGGACTAGTTTATGTTTTTAAACTCTTAGAACTGTT
P-SETit.Cys-1:1:3	AAAACTCAGATGTTTAACTTTCACCTGGACTAGTTTATGTTTTTAAACTCTTAGAACTGTT

P-SETit.Cys-1:1:2	CTGACCTGCATTGTTAAGTTTGTTCAAAATTATGGTTGTAATAATTTCGCACCTCGATAATG
P-SETit.Cys-1:1:3	CTGACCTGCATTGTTAAGTTTGTTCAAAATTATGGTTGTAATAATTTCGCACCTCGATAATG

P-SETit.Cys-1:1:2	TAIGTAAAAAATGTAATAATTTGTTGATACCTTCCCATCGTGGAAAGTGATCCTGATGTAIGG
P-SETit.Cys-1:1:3	TAIGTAAAAAATGTAATAATTTGTTGATACCTTCCCATCGTGGAAAGTGATCCTGATGTAIGG

P-SETit.Cys-1:1:2	CTATGGATCACGTCGTGGATGTTTCGAGGAGTCCTAAGGACACCTCGACGGAATACCCGGAC
P-SETit.Cys-1:1:3	CTATGGATCACGTCGTGGATGTTTCGAGGAGTCCTAAGGACACCTCGACGGAATACCCGGAC

P-SETit.Cys-1:1:2	TTAGACTGTTTTAAGTGCCTTCGGATAATTGTTGTTCTGATAGCGATTAGACGCGCTTA
P-SETit.Cys-1:1:3	TTAGACTGTTTTAAGTGCCTTCGGATAATTGTTGTTCTGATAGCGATTAGACGCGCTTA

P-SETit.Cys-1:1:2	AACCAGTTTAAGTTGGCGGTTCGCCACACTATCCCTTATTACTGATTTTGGTTTGGTT
P-SETit.Cys-1:1:3	AACCAGTTTAAGTTGGCGGTTCGCCACACTATCCCTTATTACTGATTTTGGTTTGGTT

P-SETit.Cys-1:1:2	TGGTCCATCCGAGATGAAGAAAGAGGCAAGCACATGTACTGGAATAATATTCCTGGATCG
P-SETit.Cys-1:1:3	TGGTCCATCCGAGATGAAGAAAGAGGCAAGCACATGTACTGGAATAATATTCCTGGATCG

P-SETit.Cys-1:1:2	AAGGTATGAGCATCACACATTTAAATGCTAGTATTTAAGAAGAGGCAAGCACATGTACTG
P-SETit.Cys-1:1:3	AAGGTATGAGCATCACACATTTAAATGCTAGTATTTAAGAAGAGGCAAGCACATGTACTG

FIG. 3c

P-SETit.Cys-1:1:2	AAATAATATCCGAGATGCAAGTTTACAACAATAAAGTCTGGCATTCACCTGCTCAACC
P-SETit.Cys-1:1:3	AAATAATATCCGAGATGCAAGTTTACAACAATAAAGTCTGGCATTCACCTGCTCAACC

P-SETit.Cys-1:1:2	CATGTCCAATCACATGATAATCCTACCAAACTTAGCACGAGCTGAATTAAAAATTTTCCTT
P-SETit.Cys-1:1:3	CATGTCCAATCACATGATAATCCTACCAAACTTAGCACGAGCTGAATTAAAAATTTTCCTT

P-SETit.Cys-1:1:2	AATCCGTTTTATATATGTACAAATGCCACCAATTGCCACATAAAATGCATAAGTTCITCCCA
P-SETit.Cys-1:1:3	AATCCGTTTTATATATGTACAAATGCCACCAATTGCCACATAAAATGCATAAGTTCITCCCA

P-SETit.Cys-1:1:2	GATAATTCATAGGCCACCAATTGCTATTTTATAAGAATCCTTCAGAAATTTTAAGCTGAAA
P-SETit.Cys-1:1:3	GATAATTCATAGGCCACCAATTGCTATTTTATAAGAATCCTTCAGAAATTTTAAGCTGAAA

P-SETit.Cys-1:1:2	GGAACCTTGACTAAAGGAGGAACAACAAGGATAGAGTCTAGTGCTCCATCCCATGCTACAG
P-SETit.Cys-1:1:3	GGAACCTTGACTAAAGGAGGAACAACAAGGATAGAGTCTAGTGCTCCATCCCATGCTACAG

P-SETit.Cys-1:1:2	ATTTTAGTTCAGTTTTCAACCAACAAGAAATTAATAATTTATTTCTAGCAAAATGAAAAATTC
P-SETit.Cys-1:1:3	ATTTTAGTTCAGTTTTCAACCAACAAGAAATTAATAATTTATTTCTAGCAAAATGAAAAATTC

P-SETit.Cys-1:1:2	AAGGGTCATTTTCTTAAGGTTTGAAGTTATACCAATTTGCATATATATCATAAGTATACA
P-SETit.Cys-1:1:3	AAGGGTCATTTTCTTAAGGTTTGAAGTTATACCAATTTGCATATATATCATAAGTATACA

P-SETit.Cys-1:1:2	AACTTTAGCCATATAAATTTTGTGCTGGCCACACCTTGGCTACTTTATAAAGACCCCTGCACA
P-SETit.Cys-1:1:3	AACTTTAGCCATATAAATTTTGTGCTGGCCACACCTTGGCTACTTTATAAAGACCCCTGCACA

FIG. 3d

P-SETit.Cys-1:1:2	ATTTAAGATAAAAGAAATTCGGCAAAATTAAGGGAGAAACAACAAGGACGAGTCAGGT
P-SETit.Cys-1:1:3	ATTTAAGATAAAAGAAATTCGGCAAAATTAAGGGAGAAACAACAAGGACGAGTCAGGT

P-SETit.Cys-1:1:2	GCCCCATCCCATGTTTCCATCGAGATGAAGAAGGGGCAAGCACATGTACTTGAATATAT
P-SETit.Cys-1:1:3	GCCCCATCCCATGTTTCCATCGAGATGAAGAAGGGGCAAGCACATGTACTTGAATATAT

P-SETit.Cys-1:1:2	TGGATCGAAGGTATTATCAGCATCAAAATATTGAATACGAGTAGTATTAAATACTTTGAG
P-SETit.Cys-1:1:3	TGGATCGAAGGTATTATCAGCATCAAAATATTGAATACGAGTAGTATTAAATACTTTGAG

P-SETit.Cys-1:1:2	CAGCGCGGAAGGTTCTTATGGCCTCAGTGATAGCTAAATCTAACTTTACAATATCTCTGAC
P-SETit.Cys-1:1:3	CAGCGCGGAAGGTTCTTATGGCCTCAGTGATAGCTAAATCTAACTTTACAATATCTCTGAC

P-SETit.Cys-1:1:2	ATTGCATCACATGCTCATCCCATGTGCATGATAATAATCTTACCAGCTCAGCACGAGC
P-SETit.Cys-1:1:3	ATTGCATCACATGCTCATCCCATGTGCATGATAATAATCTTACCAGCTCAGCACGAGC

P-SETit.Cys-1:1:2	CACATGAAAATTTCTTAATCCTTTTTTATATATATATAAAATGCAAAAGATTGGATCAGAG
P-SETit.Cys-1:1:3	CACATGAAAATTTCTTAATCCTTTTTTATATATATATAAAATGCAAAAGATTGGATCAGAG

P-SETit.Cys-1:1:2	CAAGTAGCTAAGTATCCTGTCATCCCTCTTCATGTCCATGAATCATATCCCCCGATGAACCA
P-SETit.Cys-1:1:3	CAAGTAGCTAAGTATCCTGTCATCCCTCTTCATGTCCATGAATCATATCCCCCGATGAACCA

P-SETit.Cys-1:1:2	CATAACCTCCTTTTATTCTTTCAAAAACAAGTTAAAAATTTTGTTCAGAAAAATGAATTT
P-SETit.Cys-1:1:3	CATAACCTCCTTTTATTCTTTCAAAAACAAGTTAAAAATTTTGTTCAGAAAAATGAATTT

FIG. 3e

P-SETit.Cys-1:1:2	TTAACTCTGGTTTTCTTAAGGTTTGATTTTTTTGCGTCTATAATAAGTTCTTTACAGAT
P-SETit.Cys-1:1:3	TTAACTCTGGTTTTCTTAAGGTTTGATTTTTTTGCGTCTATAATAAGTTCTTTACAGAT

P-SETit.Cys-1:1:2	AACTGTACCTTTGCTAGTTTATAATGAATCCTGCAGAGTTTCAAGGTGAAATTTAAGGAAC
P-SETit.Cys-1:1:3	AACTGTACCTTTGCTAGTTTATAATGAATCCTGCAGAGTTTCAAGGTGAAATTTAAGGAAC

P-SETit.Cys-1:1:2	TTGGAAGTGGGAGAACTGAGGATCGAGTCCAGTGTCTTTATCGGTTTATCAATCCCATACT
P-SETit.Cys-1:1:3	TTGGAAGTGGGAGAACTGAGGATCGAGTCCAGTGTCTTTATCGGTTTATCAATCCCATACT

P-SETit.Cys-1:1:2	AAATGATTTCTTTTGTTCAGTTGCAATGTTGCAACCCGGGATGACGAATCGAATATGCAAAT
P-SETit.Cys-1:1:3	AAATGATTTCTTTTGTTCAGTTGCAATGTTGCAACCCGGGATGACGAATCGAATATGCAAAT

P-SETit.Cys-1:1:2	CACATGTACAGGGTTTACTGGCACTTTTTTTGGATCGAAGGTACGAGCACCGCATTTGAA
P-SETit.Cys-1:1:3	CACATGTACAGGGTTTACTGGCACTTTTTTTGGATCGAAGGTACGAGCACCGCATTTGAA

P-SETit.Cys-1:1:2	TAAGAGCACTGACGTTAAGCTTCGTTAGTGGGTGAGTTTTTGCACCTGTGTAAATTTCTCT
P-SETit.Cys-1:1:3	TAAGAGCACTGACGTTAAGCTTCGTTAGTGGGTGAGTTTTTGCACCTGTGTAAATTTCTCT

P-SETit.Cys-1:1:2	ACTCGTGATTCCAGTGATCTGCATAATGTCAACGGCCGTATAGGAGCAACTACTATTAA
P-SETit.Cys-1:1:3	ACTCGTGATTCCAGTGATCTGCATAATGTCAACGGCCGTATAGGAGCAACTACTATTAA

P-SETit.Cys-1:1:2	GCATCCATTGCGCCCATCTATTTTCGATCAACGCTCACT
P-SETit.Cys-1:1:3	GCATCCATTGCGCCCATCTATTTTCGATCAACGCTCACT

FIG. 3f

P-SETit.Dzs-1:1:4	TTTTGGACGCGAGCAGCTTTAGAGCTGGGATGACGGCCTCTCTTCTGTGTCTCGAGGCG
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	TTGCGTCACCCCTAGGTTTCCCTAGGCCAGAGGTAAGATAGTTTTTGCCTGCGGCAACGCC
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	TTTAGTATTGGAACCTTGGCTGCTTTCTTCAAGGCTTTCTGTCTCCAAATGAAGAATATT
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	TTTCTTCGATGCCTCGCGAACGGGGGCCCTGACGCTGAAGAAGGAAAAGACACGATTCCC
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	CCAGGATCCACCCAGCCTCCTTTGAACCTCTTTGTACTCCGAAGGAGATTCCGGCACCAAG
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	AATAAAATCACACGATCTTTAAACCTTAAATGGAATTGATCTCTACAAAATGAAGCGCAGG
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	AAAAGTTATGTAAACGAAAGAGAAAAGCATGAAGAAAAATCAATACAGAGGAGGACAAGCGTA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	GAGTCTTAATTTCTTTGGTAAACTTGAAAACATTTTCGACCATAATCCGGGCAAGGATAGGCC
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	CTTTGGTATCAGTCCAGTCGGAGTCCAGAAATTGCCAGCTACAGCGGACAGGCCACACTC
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	CAAGCATGCGGTACTCCTCGATAATATCGCAAGTGTCTATACTTGCAGGCAAAAGAGACGAA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	GCATCGAGATGAAGGCATCACCCCTCGGCACATCGGGAGGGTCAATCTTGTATCATCAT
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----

FIG. 4a

P-SETit.Dzs-1:1:4	GAAGAGCCTCCATCTTTTAGTGACGAGGCAGTTGGGCTCACCAGTCTCTTCAGGCTCCA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	CTTCAITAGATAGAGCTAGTGTGAIGCCAATCGATAGGCCACTTGTTCGATAATGCAGCCA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	CGGGTTCAAGACTCCAGTTCGTTACATGAAGTTGAGACATCCAAACTGAGCTTGTTC
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	CGACCACTCCATTAGCACTTCTCTCCAACAAGTACTTCAGCTGGTGATGCACCTTGTGAG
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	CATTAGTGAACACTGACTGCCGAGGACTTGATTTTGTGTTTTGCAATCCACATATACG
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	TCGAAAGATGAACGAGAGCGTTGGGTGTCAACTGATGCAGGTAGATATCATACAGACGGA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	GTATATCTATAACAATTGGGTCCAACCTCAAAACGAAGACCAACATAAAGGAGATCACGGA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	AGATGACGACCTTGTTGTCTTCGGGTTTCGGAATAACCTCAGAATTGGGTGCACGGCTAG
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	CAAAGACCATCTTGTTCTGCTTCAGTAAGTCGATGTCATTGGGATGAAGCAAGCTTCAGC
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	CAAAAACAACAGTCTTTGGCATAATCTGATCACCATCGTCACCCGAAGGGCGGTTCATT
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	TTGGGGCCATTGAATACAATGAAGAACACAATTAAGCAACCAAAATGAAGTCGTCGGAAG
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----

FIG. 4b

P-SETit.Dzs-1:1:4	AAATACCAAAACCCAGTGAAGGGGCTTTAGACCTCCATCAAAGAAAGCGATAGCGGTAAAA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	GTAAATGGCACGAGCCCAACACAGGGTTATTATAGGTAGAGCGAAAGAGAAACAGTAACA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	AGGGTCAAAAGTCAAAAAAACCATTAATAAATTTAATGAAGGATTTTCGAATAAGGAAAAA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	TATATTAAATCAAAGGCAAGGAAGCAAAATCATGATGGGCCGATCTTGGGGAGTTCCGA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	AGGATGGTTGCACCATGTGTTTTAGGATCGTAAGTTACGCCCATCAGAGGAGAAGATGGC
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	CCTCGCTCACGAGGGGCTACTATTGGGAAACCAACCTTGGGAATCTCCTTCGAAGGGAGA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	AGTCCTTTTGACACTAACCATGACAGCTAGTTTGCTTTGTGGCGAGCTCTAAGTGCAGGG
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	AAGAAGAAGCGGTACGAAGAGCTCTTAGGCGTATGAGGGCTCCTTCGGAAACAAAACAAT
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	GGCTGACTGGCCCCGGGTCTTTTGGGAGGGCCGGCATCTGACTCGTCCCCCTCCAAGGTT
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	TGTCCTCAGAGGAAAGGCAATGGAGTGGCTCAGCAAAAGAGCACCTTCGACTTCCGAAGATGA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	ACATGCGTTGAAAGACCATGCTGTCCACCACATGGATTGAAAGGACCGTACGAGGAGCTA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----

FIG. 4c

P-SETit.Dzs-1:1:4	GCTGGAGAGTCCATACAAAAGATTTGCACTTGAAGAAACCCAAATCTGTAGATCATAAAG
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	CCAAAGTCCTTGGA AAAAACCGAGAAAATGATACATGGCCTCATAGAGGTGAATAATTGGA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	AATCACTATCAATTCTCTCAAGACATGATTGCAGAAATGAGGCTAACAGAAATCCACATTGA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	GAGGGATGGAGGATCGCCCCAAAAGAGCCACCAAGAAAACTCATTTGGAAGAGAGGCGGT
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	GTGAGCAACTGACTGGCAAAGAGAAACTGGATTGGATCATGCTATGGATCTCCAAACCTA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	GACCAAAGTCCAGATCAGAGAGGCCACCCATGGTATGGTAGCCTAGAGGAAGGATCACCA
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	TGATCGCCGAGGAATGGAGAGCACGACACCGGGGAGGAGGGGACATCGCCAGTCACCAT
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	ACTCGCATTTT TAGCGTCTGCTCATCTCCACCTACCCCTCCCCTAGTCCCCTATCTAGT
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----
P-SETit.Dzs-1:1:4	TGCAGTGCCCACTAGATGGTGCCACCACGCTAACCTAAACGTCAAGTCTCTCCTTCC
P-SETit.Dzs-1:1:5	-----AAACGTCAAGTCTCTCCTTCC *****
P-SETit.Dzs-1:1:4	CCGGCACCGCCCTATCTAGTTGCAATGCCACCACCTAGATGGTGCCACCACGCTAACCC
P-SETit.Dzs-1:1:5	CCGGCACCGCCCTATCTAGTTGCAATGCCACCACCTAGATGGTGCCACCACGCTAACCC *****

FIG. 4d

P-SETit.Dzs-1:1:4	TAAACGTCAAGTCTCTCTGCCCCAGCACCGCCCATCAGCAATCGTTGCCTGCCCCACAAG
P-SETit.Dzs-1:1:5	TAAACGTCAAGTCTCTCTCTGCCCCAGCACCGCCCATCAGCAATCGTTGCCTGCCCCACAAG

P-SETit.Dzs-1:1:4	CACGACACGATGGCACTTAATGGAATCCTCTTAATACCAACACTACTCCAATCCAAAAAAT
P-SETit.Dzs-1:1:5	CACGACACGATGGCACTTAATGGAATCCTCTTAATACCAACACTACTCCAATCCAAAAAAT

P-SETit.Dzs-1:1:4	TAACATTGCAGTTTGATTTTGCTCTCGACCTAAAGAAATCACAAAAATTAATTTAGGTGTC
P-SETit.Dzs-1:1:5	TAACATTGCAGTTTGATTTTGCTCTCGACCTAAAGAAATCAC-AAAAATTAATTTAGGTGTC

P-SETit.Dzs-1:1:4	TGGAATCTATGAAGTGGAGAGAGTAATTAATAAATCATGTATATATGTCAGTTGTTGT
P-SETit.Dzs-1:1:5	TGGAATCTATGAAGTGGAGAGAGTAATTAATAAATCATGTATATATGTCAGTTGTTGT

P-SETit.Dzs-1:1:4	TTGGGGAACCTGTCTCTGTGCAAAAGCAGGGTCCTTTGCCCATGTACTTTTACTATCAG
P-SETit.Dzs-1:1:5	TTGGGGAACCTGTCTCTGTGCAAAAGCAGGGTCCTTTGCCCATGTACTTTTACTATCAG

P-SETit.Dzs-1:1:4	TCAACAAGGCAGCATCTCTCATATAAACCACGAAAGTAAAGGAACCAAGACCATCACAGA
P-SETit.Dzs-1:1:5	TCAACAAGGCAGCATCTCTCATATAAACCACGAAAGTAAAGGAACCAAGACCATCACAGA

P-SETit.Dzs-1:1:4	CTCCGTGCATGAGTTATGACATGTAAGGAAATCAGCCCTGGACAAATTCAAATTGCAGAA
P-SETit.Dzs-1:1:5	CTCCGTGCATGAGTTATGACATGTAAGGAAATCAGCCCTGGACAAATTCAAATTGCAGAA

P-SETit.Dzs-1:1:4	GTCCACAGAAGACTCCATGTGTGAGTAATGACATGTAAGCCCAAATCAGCCTGGACAAAT
P-SETit.Dzs-1:1:5	GTCCACAGAAGACTCCATGTGTGAGTAATGACATGTAAGCCCAAATCAGCCTGGACAAAT

P-SETit.Dzs-1:1:4	TCCGTTGCAGAAGACCACAGTAGACTCCATGTATGAGTTAAGAGTATATGACATGTAGAG
P-SETit.Dzs-1:1:5	TCCGTTGCAGAAGACCACAGTAGACTCCATGTATGAGTTAAGAGTATATGACATGTAGAG

P-SETit.Dzs-1:1:4	CATATCAGCGCCTGGACAAATTCCTTTGCAGAAAGTTTCTCGATCCACCTCAGCTAGTCAC
P-SETit.Dzs-1:1:5	CATATCAGCGCCTGGACAAATTCCTTTGCAGAAAGTTTCTCGATCCACCTCAGCTAGTCAC

P-SETit.Dzs-1:1:4	GATGCAATCACCTTACTTTAGCAAAAGCAAAACAAACTGAGATATGCAGTCACATCCTTA
P-SETit.Dzs-1:1:5	GATGCAATCACCTTACTTTAGCAAAAGCAAAACAAACTGAGATATGCAGTCACATCCTTA

FIG. 4e

P-SETit.Dzs-1:1:4	ATAAACTCGTCATACTACCCCTCACCCCTATTATCAAAAGTAAGAACAAACAAAATACTTTTC
P-SETit.Dzs-1:1:5	ATAAACTCGTCATACTACCCCTCACCCCTATTATCAAAAGTAAGAACAAACAAAATACTTTTC

P-SETit.Dzs-1:1:4	CCATGTACCCCAATGCTGAATATCAATGGAGGCGATCAITGGGTCCAAAACAGTTAGGGA
P-SETit.Dzs-1:1:5	CCATGTACCCCAATGCTGAATATCAATGGAGGCGATCAITGGGTCCAAAACAGTTAGGGA

P-SETit.Dzs-1:1:4	AATCTCCAAATTTGACTAGATGCCATGTACCTCCAGCTTATCTACCCCTCCAACTTTTCAG
P-SETit.Dzs-1:1:5	AATCTCCAAATTTGACTAGATGCCATGTACCTCCAGCTTATCTACCCCTCCAACTTTTCAG

P-SETit.Dzs-1:1:4	TTCTGCAAAATGACAAAAACCTTATTGATCTGCACGGTGTGTGTAGCATATAAGCACTATA
P-SETit.Dzs-1:1:5	TTCTGCAAAATGACAAAAACCTTATTGATCTGCACGGTGTGTGTAGCATATAAGCACTATA

P-SETit.Dzs-1:1:4	AATAGGACCTAGATGAATGCTCAGCCCA
P-SETit.Dzs-1:1:5	AATAGGACCTAGATGAATGCTCAGCCCA

FIG. 4f

P-SETit.Gst-1:1:1	GGATGATGGATTGCTTTTGAGAAATGACTTCTTAAAGCGTCAAGCTTTTCTGACTGTGTCA
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	GGTCAGCTTCAGGTTGAAACTTATGCTTGTGCTCTCAGTAGTGTATATACCTTTGGACCA
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	ACGTTCCGGGCAGAGAACTCACATACATCAAGACATCTGGCAGAGTTTGGATGGTTGAA
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	CCAGAAAAATGCAATTTGCAAACTTGCAGGTGAGCTGCTTCTTGATGACTAACTTTATTACT
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	TTGTGTTTCGCCACCTATCAAAATTGGATCAATGGGGTTTTTGTGTGGACATAACTAATGTTA
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	AACTTGATAAAATTGTGTCACAGGATGATATGAAGTGTGCAGAAAAATATGTACAATACC
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	TCTGCCAGTGGTTACTCGATCATTTGTGAAGAAGACATAGATTTTCATTAGCAAAAAATACG
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	AGAGAAACAGTAGACATAATCAAACTGCAATTGACCGTCTGAAGCTTGTTTCCTCAACGC
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	ATTTTGAAACGTATTTTCATACACAATGGCTGTGGACATTTCTGAAAAATACAGAACAAAGTT
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	GAATGGGGAATCGATTTAGCATCTGAGCATGAAAGGTATGTGCAAGTTGTCAGTTGATCT
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	TACTGGTCTTCACCTGATTTACCTTCTTTGATTGGTTAACTGTAACTACGTATTCTGTGA
P-SETit.Gst-1:1:2	-----

FIG. 5a

P-SETit.Gst-1:1:1	AGGTATTTGACTGAGGTGATATATAAGAAGCCAGTTATTGTTTATAACTATCCCAAAGAA
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	ATAAAGCATTTTATATGAGGCTCAATGATGATCAGAAGACTGTTTCTGCTATGGAIGTT
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	CTTGCGCCACAGGTATAGATCGAATTGTTGAAAATGCTATGATGCTGTCCATTGTTCACT
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	GAAGTGCCCCACACCAATTCTACCCTCAATCAGCATGGATATAAGCAGCCAGATTCAATGTC
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	TGCTCTTAGTAGAATAAATACTATTTCTTTCTGCTTTTAGAATTTAGATATCTCTGGATT
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	CTTTTTTCGCGCTTTTCACCAATTACAAAGAACTAAAAC TG CATATAACTATATAAGATA
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	ACAAATATTACATTTTCTGAAAATAGCTGTATGCTTGCAAACTACA TGCTGGATATTTTGCT
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	TTGCCTGCTTTGTATATAGTTTGAAAGTGAGCTTTGTGGCCGATGATTTCTACCTAACCA
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	TAAATTAATTTTCCTTGGTAGGTTGGTGAATTGACTGGTGGAGCCAGAGGAGCATCTAGA
P-SETit.Gst-1:1:2	-----
P-SETit.Gst-1:1:1	TGTCCTGAAAACAGAGGTACCGACTTGCTCAATATAAATTTTGTTTCTATCAGGATCAATAT
P-SETit.Gst-1:1:2	-----CAGGAT-----T

	*

FIG. 5b

P-SETit.Gst-1:1:1	TAGGTTTCATTTGCTCGTGGTGGAGGTAGCAAGCAGTTTTTGTCATCATTTGGTTACGA
P-SETit.Gst-1:1:2	TAGGTTTCATTTGCTCGTGGTGGAGGTAGCAAGCAGTTTTTGTCATCATTTGGTTACGA

P-SETit.Gst-1:1:1	ATATTTGCTGAACATTGTCCAATAATTTGTTCTACAGAAATTTGGATCGGGGATTGCCCAT
P-SETit.Gst-1:1:2	ATATTTGCTGAACATTGTCCAATAATTTGTTCTACAGAAATTTGGATCGGGGATTGCCCAT

P-SETit.Gst-1:1:1	CACCCCTGATGCGAGCTAGTCTGCTTCATGGCGAGGGGTGACCTCGACGTGCAGGGTGC
P-SETit.Gst-1:1:2	CACCCCTGATGCGAGCTAGTCTGCTTCATGGCGAGGGGTGACCTCGACGTGCAGGGTGC

P-SETit.Gst-1:1:1	CAGGGTAGAGTGCCCATCACCCCTGACGCGAGCTAGTCTGCTTACGCAAGCAGCGACGTC
P-SETit.Gst-1:1:2	CAGGGTAGAGTGCCCATCACCCCTGACGCGAGCTAGTCTGCTTACGCAAGCAGCGACGTC

P-SETit.Gst-1:1:1	ACAAGTGTAGTAAAGGCCCTCGTTGACCCACGACCAATCCACCGCTTCCCTCTAGCACCTT
P-SETit.Gst-1:1:2	ACAAGTGTAGTAAAGGCCCTCGTTGACCCACGACCAATCCACCGCTTCCCTCTAGCACCTT

P-SETit.Gst-1:1:1	CTTCCCGAGCACCGGCAGGCAGCAGCGAGATCTAGGCAGCAGCCATCGCTCCTCTCTC
P-SETit.Gst-1:1:2	CTTCCCGAGCACCGGCAGGCAGCAGCGAGATCTAGGCAGCAGCCATCGCTCCTCTCTC

P-SETit.Gst-1:1:1	CCCCCTGCTCCTGTATAAATAGCAGGCGAGGGGCAACCAATTCCATCAACTCGTATCA
P-SETit.Gst-1:1:2	CCCCCTGCTCCTGTATAAATAGCAGGCGAGGGGCAACCAATTCCATCAACTCGTATCA

P-SETit.Gst-1:1:1	T
P-SETit.Gst-1:1:2	T
	*

FIG. 5c

P-SETit.Ifr-1:1:2	TCCACCGATCATCACACAGCCAGTAGTGGGGTGGCCAAAGCAATCAGGCACCCGGCA
P-SETit.Ifr-1:1:3	-----
P-SETit.Ifr-1:1:2	ATGCGAGCTGATGCGTGATGATGGTGCTACCAACAAACTGACTATAAAATTTCTGTATTG
P-SETit.Ifr-1:1:3	-----
P-SETit.Ifr-1:1:2	AAAGGGATTGGCCTCGATATTTTATTAGCTCCCCGGCTTTTGTCAACGACACGTTAGCATG
P-SETit.Ifr-1:1:3	-----
P-SETit.Ifr-1:1:2	CGTGCCCTTCTAGAAGCTAGTCCGGGTATTACCGCTAGAAAAGTTCCCGAAATGAAAGCATTT
P-SETit.Ifr-1:1:3	-----
P-SETit.Ifr-1:1:2	ACCACCCGTAAAGCTCATTTTCTTTATGATGAGTAGACACGGTACCAACATTGAGGACC
P-SETit.Ifr-1:1:3	-----
P-SETit.Ifr-1:1:2	GATTGGTTGGCTCCCCAAAATCTGCCCTGCCAAACTAGGGCAAGTTCATAAAATTTTGACAT
P-SETit.Ifr-1:1:3	-----
P-SETit.Ifr-1:1:2	TCGCTTGGTTGGCAATCAATTAAATCCTATTCTAAAAATTCCTGCTAGGTTTGTATATAA
P-SETit.Ifr-1:1:3	-----
P-SETit.Ifr-1:1:2	CATGCCCTATATTTTGGTCTACTCAAATTTTGGTATGGTAAATTTTGAAACACCAACAAAT
P-SETit.Ifr-1:1:3	-----
P-SETit.Ifr-1:1:2	CAGGCTATTATTATCTTATCTCTTTCTCAATTTTCATTACACAGCAAGGCAGTAATTAAA
P-SETit.Ifr-1:1:3	-----
P-SETit.Ifr-1:1:2	AGGACCGTATATACAATGGATGTAAGAATAAAATGTATAAGTAGAAAATATATTGGCATGC
P-SETit.Ifr-1:1:3	-----

FIG. 6a

P-SETit. Ifr-1:1:2 P-SETit. Ifr-1:1:3	CTCGTGCTGGTGCATGTCGATATGCTCTCAATTAGAAGTTGGAGACAGGTTATGCTTAGG -----
P-SETit. Ifr-1:1:2 P-SETit. Ifr-1:1:3	ATAGTCCCAACCTATGATATCTGTGTGTCTATACTGCCACATAAAGTAAGACATCACITTA -----
P-SETit. Ifr-1:1:2 P-SETit. Ifr-1:1:3	GAAATTACATTCTACAACCTATAAATTTCTTAGTGTGGATCCTTAATTAATTCATCATCTC -----
P-SETit. Ifr-1:1:2 P-SETit. Ifr-1:1:3	TCCTCTCAATTCCCTCATCAATTATGAAGACACCATCTTCTTCCAAATGCAAAATTTAACACT -----
P-SETit. Ifr-1:1:2 P-SETit. Ifr-1:1:3	GTCTAGGATCTAGGTTCAGGTGTTGATACTGGGTCTTGCAATGAGATCCAGTTTCTTGTTTC -----
P-SETit. Ifr-1:1:2 P-SETit. Ifr-1:1:3	TTCCAATTCTCTCTCATTAAATATAATAATCACATAAGCAAAAGATCCCTATGTAGCTGCAC -----
P-SETit. Ifr-1:1:2 P-SETit. Ifr-1:1:3	AATTAATGCTATGGAAACTATCCTAATCGGAGGGTTGGGACTGCTCCTGCCTATGGCGGC -----CCTGCCTATGGCGGC *****
P-SETit. Ifr-1:1:2 P-SETit. Ifr-1:1:3	TTATTCCCCATTTCCTAACCTGAAAAATCGAAAGGGAGTGCAATGACAGGGCAAAACACTAG TTATTCCCCATTTCCTAACCTGAAAAATCGAAAGGGAGTGCAATGACAGGGCAAAACACTAG *****

FIG. 6b

P-SETit. Ifr-1:1:2	TGTTGCCCTGCATCAATAATCGTCCATGATTATATAGAGGTAGCATGACTTTTTTAGGCGT
P-SETit. Ifr-1:1:3	TGTTGCCCTGCATCAATAATCGTCCATGATTATATAGAGGTAGCATGACTTTTTTAGGCGT

P-SETit. Ifr-1:1:2	CGTGTCCCTAATCAATCAGAAAAAGAAAGCCAAACCTAATCGCTATGGGCCGCAACCAACCGAT
P-SETit. Ifr-1:1:3	CGTGTCCCTAATCAATCAGAAAAAGAAAGCCAAACCTAATCGCTATGGGCCGCAACCAACCGAT

P-SETit. Ifr-1:1:2	GCGACTATGCGAGTATATGGAACCCGTTGCTACTCCCCCACTATATATCGTGGAGTCTGA
P-SETit. Ifr-1:1:3	GCGACTATGCGAGTATATGGAACCCGTTGCTACTCCCCCACTATATATCGTGGAGTCTGA

P-SETit. Ifr-1:1:2	TGGCAATCCAACGGCAGACG
P-SETit. Ifr-1:1:3	TGGCAATCCAACGGCAGACG

FIG. 6c

FIG. 7a

P-SETit.Nrt2-1:1:2	GCCGTCCTCCTGTTACTCTTTAAATTCATTATTACGTGACATCGGCCCGTTGATAAGCCGT
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----
P-SETit.Nrt2-1:1:2	GCTCCTTGTCGCTAATTCTTATTACGTGCTGATAGAGCGGAGTCAATCAAACGTTGCACT
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----
P-SETit.Nrt2-1:1:2	TTGTAACCCCTTAATCTTTTGCTAAGAGTCACATGACCCCGTACATCTCGATCGATCCTCTTT
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----
P-SETit.Nrt2-1:1:2	TTAGTTGGCGCGGGGTTTTACCATGTGAAGCAATGTGCCGGCATGCTGCTGTCGCAACT
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----
P-SETit.Nrt2-1:1:2	AGCTCTTCATCAAGCTATCGACAGATGAGATGCGCTCCCATTTGGAACCGAAATGGGTGGA
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----
P-SETit.Nrt2-1:1:2	AATTCTGTTTCGATTCTGTCTGTCGCCGACCGTGCAGAAAGTGAAACCAACCCCTTCCCCTCGCCG
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----
P-SETit.Nrt2-1:1:2	CAGGCAITAGTCCGCGTGGATTTTGAACACCAACAGCTGACATAATGCCCTCCATGTCCATT
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----
P-SETit.Nrt2-1:1:2	CCTGCCGTGGGAATCTCTGCACCTGGTCTGCCTAGTCTCTACAGGCTGCGGCCGCACCATC
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----
P-SETit.Nrt2-1:1:2	TAAATGCATGTTTGAATATCAGTAGTTAAATTTTATCACATGTCACATCGGATATTGCGGA
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----
P-SETit.Nrt2-1:1:2	TGCTAATTAGTAGGACTAAACATAGCTAATTATAAAATTAATTGCAGAACTTCGGGGGCTA
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----
P-SETit.Nrt2-1:1:2	ATTCAATGAGACCAATTTATTGAGGCTAATTAATCTATCATATTAGCAAAATGGTTACTGTAGC
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----

FIG. 7b

P-SETit.Nrt2-1:1:2	ACCATAATTGTCAAATCATGGACTAATTAGCCCTTAATAGATTATCTCACAAATTAGACTC
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----
P-SETit.Nrt2-1:1:2	CATCTGTGTAATTAGTTTATAATTAGATTATATTTAATACTTCTAATTAGTATCCAAAT
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----
P-SETit.Nrt2-1:1:2	ATCCGAITGACIGTGAAGTTTAACACATGTGAGCCAAACACCCCCCGACCCCGGTGCG
P-SETit.Nrt2-1:1:3	-----CCGACCCCGGTGCG

P-SETit.Nrt2-1:1:2	CGCGCCGCGCCGCGCGTTGGATGCCGCCCTGCCACGCCATGCGACGCAACGCCCTGCAC
P-SETit.Nrt2-1:1:3	CGCGCCGCGCCGCGCGTTGGATGCCGCCCTGCCACGCCATGCGACGCAACGCCCTGCAC

P-SETit.Nrt2-1:1:2	TGCATTTTCGTGGCCTTGCGTAGGGGCACCGGAAGAGCCCGCTGGTTTCGTTTCGTCCC
P-SETit.Nrt2-1:1:3	TGCATTTTCGTGGCCTTGCGTAGGGGCACCGGAAGAGCCCGCTGGTTTCGTTTCGTCCC

P-SETit.Nrt2-1:1:2	CTGGCCGCGTCAGCTGATTTCGAGCAGGGTCGAAATCGATCGCGCGGTCGCCGCATCC
P-SETit.Nrt2-1:1:3	CTGGCCGCGTCAGCTGATTTCGAGCAGGGTCGAAATCGATCGCGCGGTCGCCGCATCC

P-SETit.Nrt2-1:1:2	CACCAAGCCGGAGCCCTTCGGGGCCCTCTAAAAGCAAGTCAGGCTCGCGAAGTGACCGA
P-SETit.Nrt2-1:1:3	CACCAAGCCGGAGCCCTTCGGGGCCCTCTAAAAGCAAGTCAGGCTCGCGAAGTGACCGA

FIG. 7c

P-SETit.Nrt2-1:1:2	AAAGATACATTACTACCAGCTGCAGCGCTGCTGTTGGCCCTGCCCTCGTCAAGATCTGAC
P-SETit.Nrt2-1:1:3	AAAGATACATTACTACCAGCTGCAGCGCTGCTGTTGGCCCTGCCCTCGTCAAGATCTGAC

P-SETit.Nrt2-1:1:2	TTTTGAATCGCATAATTAGCAGCTTGTTTATTAAAGCTTAAACGATTGATCCCTACTCCTTG
P-SETit.Nrt2-1:1:3	TTTTGAATCGCATAATTAGCAGCTTGTTTATTAAAGCTTAAACGATTGATCCCTACTCCTTG

P-SETit.Nrt2-1:1:2	CCGACA
P-SETit.Nrt2-1:1:3	CCGACA

FIG. 7d

P-SETit.Ppc-1:1:3 P-SETit.Ppc-1:1:4	CCATCTCTCCTTGAAAGAGAACTATGTTTAAAGTTTCAACAAGAGACAACAATGCCCTTGT -----
P-SETit.Ppc-1:1:3 P-SETit.Ppc-1:1:4	GAACTGACAAAAGAGATAACAGGAAAAGACAAGGATTTCAGGGAAGCAAGAGGCAAGTGA -----
P-SETit.Ppc-1:1:3 P-SETit.Ppc-1:1:4	GCAGTGAATTGCAGTACTACCGAACAAGACTGATTTTTTAGTACAGTACCCTAATTATTTTG -----
P-SETit.Ppc-1:1:3 P-SETit.Ppc-1:1:4	GAAATAATGAATAAGAGAGAGGATAATGTTGGACGAATAAAAAATTGTGAACGGAAAAATAACTA -----
P-SETit.Ppc-1:1:3 P-SETit.Ppc-1:1:4	GATATGTTTTGGGAGGCACTAACAAAGACTTTTAATTTTGGAAAGAGAGATACAAACATATAAA -----
P-SETit.Ppc-1:1:3 P-SETit.Ppc-1:1:4	CATGTTAGTGGATAGATAATATGGTGCTCTTATGTTAGAAAAAGTACATTATTTTTTATGGT -----
P-SETit.Ppc-1:1:3 P-SETit.Ppc-1:1:4	TATTTTCATAGATCTGGAACATTAAATACAAAACTAATCCTATGGATACAAAACTGCATGA -----
P-SETit.Ppc-1:1:3 P-SETit.Ppc-1:1:4	AAAGTAATCATGAATTTATTCTAATATTGGGCATCATATTTAAGTCACGTTGCAGAAATTT -----
P-SETit.Ppc-1:1:3 P-SETit.Ppc-1:1:4	GAACTTAAAACTCGATTCGTACGTGGAGAAACAAAAAGATCAAAATCTCATTAGAGGTAT -----
P-SETit.Ppc-1:1:3 P-SETit.Ppc-1:1:4	ATTGGACCAATTTAAAGTAGTTTGGGGGAATAAATCGAGCCTAAGTTTTATTAGGGGTTA -----
P-SETit.Ppc-1:1:3 P-SETit.Ppc-1:1:4	AGAGGACAGATAAAGTAGATTGGTGATGGTAGTAAAAATGGACATTTTCCTAGTTGTATCT -----
P-SETit.Ppc-1:1:3 P-SETit.Ppc-1:1:4	GGTATGTACTATTTGGCTTAACATATATTAAAGTCCCAAGTAGTGCAAAATGGGATTCAAA -----

FIG. 8a

P-SETit.Ppc-1:1:3	TACTAAATTCTCTTTACGTAGAGATGAGGAAGGAGAATTACAAAGCAGCATTGCCACAGC
P-SETit.Ppc-1:1:4	-----
P-SETit.Ppc-1:1:3	CTTGCTTCAGTTTTGCTCGATGCAAGCAGGGTGGAGTGGTGACAGGCAATGGACTAGCGG
P-SETit.Ppc-1:1:4	-----
P-SETit.Ppc-1:1:3	CACGGAAGACAACATCATGTCATGTGCTTCCAGAGTTGCCAACGGCAAAAGAGCAGCAATG
P-SETit.Ppc-1:1:4	CACGGAAGACAACATCATGTCATGTGCTTCCAGAGTTGCCAACGGCAAAAGAGCAGCAATG

P-SETit.Ppc-1:1:3	TGTGTAGTTCGGCCATGGGCTCGGTCACAGGTGGGTTCTCTCCAGAACAGGCAGGAGAGA
P-SETit.Ppc-1:1:4	TGTGTAGTTCGGCCATGGGCTCGGTCACAGGTGGGTTCTCTCCAGAACAGGCAGGAGAGA

P-SETit.Ppc-1:1:3	GGGGGTAGCTGGCTGAGCATCCATCCGTGATGAGCCTAAACCGTTGCGCAAAACGGGCAGC
P-SETit.Ppc-1:1:4	GGGGGTAGCTGGCTGAGCATCCATCCGTGATGAGCCTAAACCGTTGCGCAAAACGGGCAGC

P-SETit.Ppc-1:1:3	TGGAGAGATAATGCCGAATATGTGATCCTCCACGGCGTTGCCACAGATGTCACGGATCATG
P-SETit.Ppc-1:1:4	TGGAGAGATAATGCCGAATATGTGATCCTCCACGGCGTTGCCACAGATGTCACGGATCATG

P-SETit.Ppc-1:1:3	CAIGCATGTCGTCAITTAGCAGATGTTTGAGTCTGATACACCCCTTCACACCAAGCAAAT
P-SETit.Ppc-1:1:4	CAIGCATGTCGTCAITTAGCAGATGTTTGAGTCTGATACACCCCTTCACACCAAGCAAAT

P-SETit.Ppc-1:1:3	ATAACCAAGATAAGGATTCGAGGAAGCAGAAAGGAGGCAAGTGAGCAGTGACAAGTACGTC
P-SETit.Ppc-1:1:4	ATAACCAAGATAAGGATTCGAGGAAGCAGAAAGGAGGCAAGTGAGCAGTGACAAGTACGTC

P-SETit.Ppc-1:1:3	CACAACACAATCCAGACGAAAACGAACACATCAATGCCCTCGGGCCCAATCGTAGTAATG
P-SETit.Ppc-1:1:4	CACAACACAATCCAGACGAAAACGAACACATCAATGCCCTCGGGCCCAATCGTAGTAATG

FIG. 8b

P-SETit.Ppc-1:1:3	CTGCAACAAACAAAAGTCCTGTGTGAAGACGGTCTCTATTAAATAGCCACACATGGAGCCGAT
P-SETit.Ppc-1:1:4	CTGCAACAAACAAAAGTCCTGTGTGAAGACGGTCTCTATTAAATAGCCACACATGGAGCCGAT

P-SETit.Ppc-1:1:3	ATATAATCCGAAAGATAATGTATAATAGAGAAAGCGTCAATGTTTTTCAAAAAATAAAAAAT
P-SETit.Ppc-1:1:4	ATATAATCCGAAAGATAATGTATAATAGAGAAAGCGTCAATGTTTTTCAAAAAATAAAAAAT

P-SETit.Ppc-1:1:3	AAAAATAAACTGGGAACAAGCCCATCGAAGGCCGGGAGCGAGCTTGCTTTTCAGAGTCA
P-SETit.Ppc-1:1:4	AAAAATAAACTGGGAACAAGCCCATCGAAGGCCGGGAGCGAGCTTGCTTTTCAGAGTCA

P-SETit.Ppc-1:1:3	GTGAGCCACCGGGGGGAGCTGACGGGTAGGGGAAGAGGAACAACATCGTGCAATGTGC
P-SETit.Ppc-1:1:4	GTGAGCCACCGGGGGGAGCTGACGGGTAGGGGAAGAGGAACAACATCGTGCAATGTGC

P-SETit.Ppc-1:1:3	TTCAAGAGTTGCCAACGGCAAAAGGAGCAGCAGTGTGTGTAGTTCGGCTATGGGCTCAGTC
P-SETit.Ppc-1:1:4	TTCAAGAGTTGCCAACGGCAAAAGGAGCAGCAGTGTGTGTAGTTCGGCTATGGGCTCAGTC

P-SETit.Ppc-1:1:3	ACAGGTGGGTTTCGTCTCCAGAACCCAGCAGGAGAGGGGGTTTGTGGCTGGCTGTGCATC
P-SETit.Ppc-1:1:4	ACAGGTGGGTTTCGTCTCCAGAACCCAGCAGGAGAGGGGGTTTGTGGCTGGCTGTGCATC

P-SETit.Ppc-1:1:3	CATCCGTGATGAGCCTAAACCGTTGCGCAAAATGGACACCTGGAGCGATAATGTGAATATG
P-SETit.Ppc-1:1:4	CATCCGTGATGAGCCTAAACCGTTGCGCAAAATGGACACCTGGAGCGATAATGTGAATATG

P-SETit.Ppc-1:1:3	TGATCTCCACGGCGTTGCCACAAAATGTCACTGATCATCCATGTTGTCTATAGCACATG
P-SETit.Ppc-1:1:4	TGATCTCCACGGCGTTGCCACAAAATGTCACTGATCATCCATGTTGTCTATAGCACATG

FIG. 8c

P-SETit.Ppc-1:1:3	CTTGAGTCCAAGTCCCTCCACACCAAGCAAATATAGCCAAAGCAAGGATTCAAGGAAGC
P-SETit.Ppc-1:1:4	CTTGAGTCCAAGTCCCTCCACACCAAGCAAATATAGCCAAAGCAAGGATTCAAGGAAGC

P-SETit.Ppc-1:1:3	AAGAAGGCGAGTGAGCAGTGACAAAAGTAIGTCCACAGCACAAATCCGTACGAAAAACGAGCG
P-SETit.Ppc-1:1:4	AAGAAGGCGAGTGAGCAGTGACAAAAGTAIGTCCACAGCACAAATCCGTACGAAAAACGAGCG

P-SETit.Ppc-1:1:3	CAICAGTGCCCTCAGCGCCCAATCGTAGTGTTCGCGATCAAAATAAGTCCGTGTAAGCCGG
P-SETit.Ppc-1:1:4	CAICAGTGCCCTCAGCGCCCAATCGTAGTGTTCGCGATCAAAATAAGTCCGTGTAAGCCGG

P-SETit.Ppc-1:1:3	TCTCTATTAAATTGCCACGATGAAGCCGATGTGTGGTCCGAAAGATAATATGCAATAAT
P-SETit.Ppc-1:1:4	TCTCTATTAAATTGCCACGATGAAGCCGATGTGTGGTCCGAAAGATAATATGCAATAAT

P-SETit.Ppc-1:1:3	AGAGAAGCGTTATGTTTCCCTGAAAAAAACCTGGGAACAAGCCTGTGCAAGGCCGGGA
P-SETit.Ppc-1:1:4	AGAGAAGCGTTATGTTTCCCTGAAAAAAACCTGGGAACAAGCCTGTGCAAGGCCGGGA

P-SETit.Ppc-1:1:3	GCCTCGCTTCCGTCTTGCTTTTTCACAGTCAGTGAGCCACCGGGGGGAGCTGACGGGTA
P-SETit.Ppc-1:1:4	GCCTCGCTTCCGTCTTGCTTTTTCACAGTCAGTGAGCCACCGGGGGGAGCTGACGGGTA

P-SETit.Ppc-1:1:3	GGGGAAGAGGAAGACAGCACCGTGCAATGTGCTTCCAGAGTTGCCAACGGCAAATGAGCAG
P-SETit.Ppc-1:1:4	GGGGAAGAGGAAGACAGCACCGTGCAATGTGCTTCCAGAGTTGCCAACGGCAAATGAGCAG

P-SETit.Ppc-1:1:3	CAGTGTGTGTAGTTTCGGCCATGGGCTCGGTACACAGGTGGGTTTCGTCTCCAGAACCCAGC
P-SETit.Ppc-1:1:4	CAGTGTGTGTAGTTTCGGCCATGGGCTCGGTACACAGGTGGGTTTCGTCTCCAGAACCCAGC

FIG. 8d

P-SETit.Ppc-1:1:3	AGGAGAGGGGGTATGTGGCTGGCTGTGCAICCATCCGTGATGAGCCTAAACCGTTGCGCA
P-SETit.Ppc-1:1:4	AGGAGAGGGGGTATGTGGCTGGCTGTGCAICCATCCGTGATGAGCCTAAACCGTTGCGCA

P-SETit.Ppc-1:1:3	AACGGACACCTAGAGCGATAATGTATATGTATCTCCACGGCGTTGCCACAAATGTCAC
P-SETit.Ppc-1:1:4	AACGGACACCTAGAGCGATAATGTATATGTATCTCCACGGCGTTGCCACAAATGTCAC

P-SETit.Ppc-1:1:3	TGATCATGCATGTTGTCTATATAGCACATGCTTGAGTCCAAGTCCCTCCACACCAAGCA
P-SETit.Ppc-1:1:4	TGATCATGCATGTTGTCTATATAGCACATGCTTGAGTCCAAGTCCCTCCACACCAAGCA

P-SETit.Ppc-1:1:3	AATTAATTATAGCCAAGAGAAGGATTCGAGGAAGAAGGCGATTGAGCAGTGACAAGT
P-SETit.Ppc-1:1:4	AATTAATTATAGCCAAGAGAAGGATTCGAGGAAGAAGGCGATTGAGCAGTGACAAGT

P-SETit.Ppc-1:1:3	ACGTCGACAGCACAAACCCAGACGAAACACGAGCAACGAGCACATCGCTCCGACGCGCTGC
P-SETit.Ppc-1:1:4	ACGTCGACAGCACAAACCCAGACGAAACACGAGCAACGAGCACATCGCTCCGACGCGCTGC

P-SETit.Ppc-1:1:3	CCCTCGGCCCTCCCTTGCAITTCGTGATTCGCCGCCGGTCAATGCCCTCCGCTTGAAAA
P-SETit.Ppc-1:1:4	CCCTCGGCCCTCCCTTGCAITTCGTGATTCGCCGCCGGTCAATGCCCTCCGCTTGAAAA

P-SETit.Ppc-1:1:3	AAAAAAAGCCCCCTTTCCATCCGCCATGAGGCGTGCAATCCCGTGCACACACTCGCCGA
P-SETit.Ppc-1:1:4	AAAAAAAGCCCCCTTTCCATCCGCCATGAGGCGTGCAATCCCGTGCACACACTCGCCGA

P-SETit.Ppc-1:1:3	CTCCCCATCCGTTATTTTGTGTTTTTTAGAACCCCATCCGTTATTTAAACCCACCCGCG
P-SETit.Ppc-1:1:4	CTCCCCATCCGTTATTTTGTGTTTTTTAGAACCCCATCCGTTATTTAAACCCACCCGCG

P-SETit.Ppc-1:1:3	CGCCTCGCTCGACCTCGTGCCA
P-SETit.Ppc-1:1:4	CGCCTCGCTCGACCTCGTGCCA

FIG. 8e

P-SETit.Prx3-1:1:3	-----
P-SETit.Prx3-1:1:4	ACGCAAAATGACAAAATAATGGTTACACCAAAATAGGTTAACGCAAAATGACAAAATAATGGTT
P-SETit.Prx3-1:1:3	-----
P-SETit.Prx3-1:1:4	ACACAAAACGTCAGTCTAAATCTGTTTATGAAATCTATACATATACCTGTAGCTTGAAAGCA
P-SETit.Prx3-1:1:3	-----
P-SETit.Prx3-1:1:4	ACTGCTAGCACGAGCAACAATCTCGAATGACAAAATAATGGTTTCTCCACTCATCTGCAAA
P-SETit.Prx3-1:1:3	-----
P-SETit.Prx3-1:1:4	TAAGAAAATCGCTCAGGCAAAATCTCTTAAAGTGCAGAAAAATGTGGAGTTGAACAAAAT
P-SETit.Prx3-1:1:3	-----
P-SETit.Prx3-1:1:4	AAATCACTACCGACACATTATTCTGAGGGGCAAAACGCAGATCCGGGCCACAAAAGCAACC
P-SETit.Prx3-1:1:3	-----
P-SETit.Prx3-1:1:4	GGATTAGAAGCTGACAAGCTTGGAGGCTGTGTTGACTCAACGAGCTTGGAGATTGGCAGA
P-SETit.Prx3-1:1:3	-----
P-SETit.Prx3-1:1:4	TCCGGTGAAGGTGGCTGCAGATCTGTGCAGGGAGTTGTCAAATGCACAAGTACTATCATTC
P-SETit.Prx3-1:1:3	-----
P-SETit.Prx3-1:1:4	TAAACTAGGATTAGCTTCTACTGCTCACCTTTTACAAAGCAGTCAAAGTCAGCATGCGGT
P-SETit.Prx3-1:1:3	-----
P-SETit.Prx3-1:1:4	GGCACCAGCGGAAGGATCGGGCTTGTAACGACAGTTTCTGATGTTAATCGCGTGTTCAG
P-SETit.Prx3-1:1:3	-----
P-SETit.Prx3-1:1:4	AGATTGAGTAAAGTGCTGTTAAATTTTCCAGAAGCCTAGGAAAAAACACATCTGGACCCTA
P-SETit.Prx3-1:1:3	-----
P-SETit.Prx3-1:1:4	CCTTAAGCAACAACACGTGCTGCTTCCAGAAATAGCAGCATTATAATCCTGTCAAACAAT

FIG. 9a

P-SETit,Prx3-1:1:3	-----
P-SETit,Prx3-1:1:4	ACCAC TTTGCAATATGTCAAACAAAACACATGGATAAACTGAAATGAAAGTCATCCCTTT
P-SETit,Prx3-1:1:3	-----
P-SETit,Prx3-1:1:4	GAAGCCAAAGGTAGTCTCCGATAGTCAACAAGTATTCTTCGACGACCATCACATACAC
P-SETit,Prx3-1:1:3	-----
P-SETit,Prx3-1:1:4	ACATACA AACTAGCAGCATCATATAATCATATAACAGTGATCTGAACGGAATTGTTAGACGATTT
P-SETit,Prx3-1:1:3	-----
P-SETit,Prx3-1:1:4	ACATTTCCCTCGCTATAGATTTATTCAAAAATAAGGCCAAACATCTTCTATGGATGTTCTAA
P-SETit,Prx3-1:1:3	-----
P-SETit,Prx3-1:1:4	TCATAACTAATGTAACATCAAGAGAAAAAAGGTAATGCTTTGACCAAATTGGTGAAATAT
P-SETit,Prx3-1:1:3	-----
P-SETit,Prx3-1:1:4	GGTAATATAACACATTATAATTATGAACCTAATCAAAAGTGTCTTGGGCCACATAAAATAA
P-SETit,Prx3-1:1:3	-----
P-SETit,Prx3-1:1:4	ATTAAGAGATATTIGCCAACGAATATAATGCCTTCTTTTTTAATCAATGCTTGCTTACAA
P-SETit,Prx3-1:1:3	-----
P-SETit,Prx3-1:1:4	ATTACAAGCATATCCCTGTGAGGGGCACACAAAATCTGGCCACCACATCCGGGTTTGGTA
P-SETit,Prx3-1:1:3	-----
P-SETit,Prx3-1:1:4	GAAGAAACATCATATCAGAATAACATATACATTAAACAGCTCTCCGATCAGTTGCGTAAT
P-SETit,Prx3-1:1:3	-----
P-SETit,Prx3-1:1:4	AACATATCAGAATAACATCATATCTAGATATAGTATATGTCTAGATGCATAATAATATCT
P-SETit,Prx3-1:1:3	-----
P-SETit,Prx3-1:1:4	ATAAATTTAGAAAAGCTAAAACGACCTACAATTTGGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTCTT
P-SETit,Prx3-1:1:3	-----
P-SETit,Prx3-1:1:4	TATTTAGATTTCGATCGGTTACGTAATAGTTTCCCTTTAATTATTATTCATGGCAGCTTCCACT

FIG. 9b

P-SETit.Prx3-1:1:3	-----
P-SETit.Prx3-1:1:4	GACTTACTAAGAAAATCATAGACAAAATTATTTTCAGCTGATGCATGACAAAAATAAAATAA
P-SETit.Prx3-1:1:3	-----CCTACCTACTAAAACTTTTGGCCCTTTCTTCTCAGAAAAATGTTGGTAAGAGTAAAT
P-SETit.Prx3-1:1:4	TGCTTGCCTACCTACTAAAACTTTTGGCCCTTTCTTCTCAGAAAAATGTTGGTAAGAGTAAAT

P-SETit.Prx3-1:1:3	TACCAGAGTAGACCCGGGAAAGGGGAGGAGGAGAAACATAAGACAGCTATGAATCAGGAGCC
P-SETit.Prx3-1:1:4	TACCAGAGTAGACCCGGGAAAGGGGAGGAGGAGGAGAAACATAAGACAGCTATGAATCAGGAGCC

P-SETit.Prx3-1:1:3	TAGTCAAAATGAGCAGGTAACTTGTCCATGTCACCTTTTTTTTGGTCTCCTCCAGGGTT
P-SETit.Prx3-1:1:4	TAGTCAAAATGAGCAGGTAACTTGTCCATGTCACCTTTTTTTTGGTCTCCTCCAGGGTT

P-SETit.Prx3-1:1:3	CAGCAGTTGCTTGGGATGCTAAAAAGTTTGTGACCTCTTTTGGGCGATGTAACATGCTATC
P-SETit.Prx3-1:1:4	CAGCAGTTGCTTGGGATGCTAAAAAGTTTGTGACCTCTTTTGGGCGATGTAACATGCTATC

P-SETit.Prx3-1:1:3	AGTATAGTTGCTAGGGATATAAAATTTTACTCCTCTACCATATGCAAGAAGCCACGAACC
P-SETit.Prx3-1:1:4	AGTATAGTTGCTAGGGATATAAAATTTTACTCCTCTACCATATGCAAGAAGCCACGAACC

P-SETit.Prx3-1:1:3	TATCTGCTCTTTTGCAATGCATTTCATGACAAAACCTACAGATGTGCAATGCATGCCCTCTGAAGT
P-SETit.Prx3-1:1:4	TATCTGCTCTTTTGCAATGCATTTCATGACAAAACCTACAGATGTGCAATGCATGCCCTCTGAAGT

P-SETit.Prx3-1:1:3	CTTCTGACAGTAACCTACCTAAAAAAATCTTCTGACAGTAACCTGCCCTAAAAAAAGTA
P-SETit.Prx3-1:1:4	CTTCTGACAGTAACCTACCTAAAAAAATCTTCTGACAGTAACCTGCCCTAAAAAAAGTA

P-SETit.Prx3-1:1:3	TGCTGACAGTAACAAAGCACGCTGTTGTTTTTGTTCCTTGAAGGAACCGGCCACTGATACG
P-SETit.Prx3-1:1:4	TGCTGACAGTAACAAAGCACGCTGTTGTTTTTGTTCCTTGAAGGAACCGGCCACTGATACG

FIG. 9c

P-SETit.Prx3-1:1:3	TGCTGCACGGAAGAACCAAGCTTCTCCCGACCTGTGTTGAGTTTGGAGCTTTCAAACAA
P-SETit.Prx3-1:1:4	TGCTGCACGGAAGAACCAAGCTTCTCCCGACCTGTGTTGAGTTTGGAGCTTTCAAACAA

P-SETit.Prx3-1:1:3	ACAACATCCAAGCTAAGTCCCTCCAGGAACCTGCTGCTGCTCTCGTGACAAGAAATGTAGG
P-SETit.Prx3-1:1:4	ACAACATCCAAGCTAAGTCCCTCCAGGAACCTGCTGCTGCTCTCGTGACAAGAAATGTAGG

P-SETit.Prx3-1:1:3	CCATGCGAGCACCTAACACACACGGATCATCAGCGCCGCTGTGGCTCAGAGTTGGTACACCA
P-SETit.Prx3-1:1:4	CCATGCGAGCACCTAACACACACGGATCATCAGCGCCGCTGTGGCTCAGAGTTGGTACACCA

P-SETit.Prx3-1:1:3	CATCATATCGCCTGGATTGGTCTGTGTACTTGTGTCCCTGGGAAAATCAGTCACCTTATT
P-SETit.Prx3-1:1:4	CATCATATCGCCTGGATTGGTCTGTGTACTTGTGTCCCTGGGAAAATCAGTCACCTTATT

P-SETit.Prx3-1:1:3	TTTAGACCCCTGGATTGAACACACAGAATAATGCAATGCAACCATGTTAAGCATGTTGTGCA
P-SETit.Prx3-1:1:4	TTTAGACCCCTGGATTGAACACACAGAATAATGCAATGCAACCATGTTAAGCATGTTGTGCA

P-SETit.Prx3-1:1:3	CAGCCGTTTGACAAGCCATTCCCCATCTTTTCATGTAGTGATCCTCACCTAGCTAATGTAA
P-SETit.Prx3-1:1:4	CAGCCGTTTGACAAGCCATTCCCCATCTTTTCATGTAGTGATCCTCACCTAGCTAATGTAA

P-SETit.Prx3-1:1:3	CACGGCAAAACTACCCCTAATTGGCAGTAGAACTCTGATGTATGGAACCATGACGAATAA
P-SETit.Prx3-1:1:4	CACGGCAAAACTACCCCTAATTGGCAGTAGAACTCTGATGTATGGAACCATGACGAATAA

P-SETit.Prx3-1:1:3	ATGGAATAATCTTAGACGCTACTACTACTCATCTTGAATCCAGAAGCTTGTGTACCTTT
P-SETit.Prx3-1:1:4	ATGGAATAATCTTAGACGCTACTACTACTCATCTTGAATCCAGAAGCTTGTGTACCTTT

FIG. 9d

P-SETit.Prx3-1:1:3	CATTATCATTTCCACAAAGACAGGGGATACTGATACGTGTTCAATGATGACCGAACCATTA
P-SETit.Prx3-1:1:4	CATTATCATTTCCACAAAGACAGGGGATACTGATACGTGTTCAATGATGACCGAACCATTA

P-SETit.Prx3-1:1:3	AAAACCAAAGAAACCAGGGGCATAGTCTGCATATGGTCGTCATTAAATAGTAAATTAAAG
P-SETit.Prx3-1:1:4	AAAACCAAAGAAACCAGGGGCATAGTCTGCATATGGTCGTCATTAAATAGTAAATTAAAG

P-SETit.Prx3-1:1:3	TTCAAACGTGAACAACCCCTTGTTGTATAACAAAAGAGCTGGACTAACTATGAAGCAAAAC
P-SETit.Prx3-1:1:4	TTCAAACGTGAACAACCCCTTGTTGTATAACAAAAGAGCTGGACTAACTATGAAGCAAAAC

P-SETit.Prx3-1:1:3	CATGCTTTTCGCCGAGGCTCCTCTGAACCTTTGGTTGCTTGGTTTCACATAGTGTTAAACT
P-SETit.Prx3-1:1:4	CATGCTTTTCGCCGAGGCTCCTCTGAACCTTTGGTTGCTTGGTTTCACATAGTGTTAAACT

P-SETit.Prx3-1:1:3	GTTAATAAGCGAGGTTATATAGTTCGGGTGAATATATTACTACTGGGACGAACTGATATC
P-SETit.Prx3-1:1:4	GTTAATAAGCGAGGTTATATAGTTCGGGTGAATATATTACTACTGGGACGAACTGATATC

P-SETit.Prx3-1:1:3	TACCACATACTACTGTAAAGCTGCCCTAAATTTTGTGTAGCTAGATTTCCCGGAAGGGGG
P-SETit.Prx3-1:1:4	TACCACATACTACTGTAAAGCTGCCCTAAATTTTGTGTAGCTAGATTTCCCGGAAGGGGG

P-SETit.Prx3-1:1:3	CTCTTGTAATGCTGCAGAGGACATATTCAACTGATCAATTTATAGACAGAAAAGTTGCATAT
P-SETit.Prx3-1:1:4	CTCTTGTAATGCTGCAGAGGACATATTCAACTGATCAATTTATAGACAGAAAAGTTGCATAT

P-SETit.Prx3-1:1:3	TCTATCATTTGTGCTAGCCCCCTAGCTATATGATCAGCATAATCAGCAATCCATCATATCT
P-SETit.Prx3-1:1:4	TCTATCATTTGTGCTAGCCCCCTAGCTATATGATCAGCATAATCAGCAATCCATCATATCT

FIG. 9e

FIG. 9f

P-SETit.Rcc3-1:1:1	TATCGGCGACCGCTAAGAGAAGACATTTAAAAATAAGTAGTCGGCATTGTGATAAAAGAG
P-SETit.Rcc3-1:1:10	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	-----GTCGGCATTGTGATAAAAGAG
P-SETit.Rcc3-1:1:1	AGCGCGATTACTGATGTGCAGGTTCTCGATTGTTGATGAAGTCGACTAGTCGGAGTCGAT
P-SETit.Rcc3-1:1:10	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	AGCGCGATTACTGATGTGCAGGTTCTCGATTGTTGATGAAGTCGACTAGTCGGAGTCGAT
P-SETit.Rcc3-1:1:1	TCTGACTAGTTATTGATTGTATGGAACCCGCCCTCGACTAGTTTTCTAGTCGAGACGAGT
P-SETit.Rcc3-1:1:10	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	TCTGACTAGTTATTGATTGTATGGAACCCGCCCTCGACTAGTTTTCTAGTCGAGACGAGT
P-SETit.Rcc3-1:1:1	AGTCGAAGTAGACCATCCTCAACTACTTTTTCTAGTTGAGATGAGTAGTCGAAAGTAGTCGT
P-SETit.Rcc3-1:1:10	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	AGTCGAAGTAGACCATCCTCAACTACTTTTTCTAGTTGAGATGAGTAGTCGAAAGTAGTCGT
P-SETit.Rcc3-1:1:1	CGGCGACTTGATTATTGCCTCAATCTGTGTGTGACTTGATCGACGAGCCGTATGCAGCA
P-SETit.Rcc3-1:1:10	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	CGGCGACTTGATTATTGCCTCAATCTGTGTGTGACTTGATCGACGAGCCGTATGCAGCA
P-SETit.Rcc3-1:1:1	GCTTGCGGTGGAAACCGACTCAGTCTTCGATTGGAACACGGAGCGCGTCAATTCTATGTC
P-SETit.Rcc3-1:1:10	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	GCTTGCGGTGGAAACCGACTCAGTCTTCGATTGGAACACGGAGCGCGTCAATTCTATGTC

FIG. 10a

P-SETit.Rcc3-1:1:1	GACGTAGATTGTCCTGCTTGGAACCTCCAACCTCAGTGACTTGCTTCTTGTGAGTAGATTG
P-SETit.Rcc3-1:1:10	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	GACGTAGATTGTCCTGCTTGGAACCTCCAACCTCAGTGACTTGCTTCTTGTGAGTAGATTG
P-SETit.Rcc3-1:1:1	ATCTTGATGATGAGGTCCCTTCAAGCTCGCCTGATGATCTCGACGATCACCTCTACCTGAC
P-SETit.Rcc3-1:1:10	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	ATCTTGATGATGAGGTCCCTTCAAGCTCGCCTGATGATCTCGACGATCACCTCTACCTGAC
P-SETit.Rcc3-1:1:1	GCGCCAACTGTTGGTGCTTAGACCCAGCAACCTACCGAGGGGGTACCCGAGGTAGTGT
P-SETit.Rcc3-1:1:10	-----AGACCCAGCAACCTACCGAGGGGGTACCCGAGGTAGTGT
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	GCGCCAACTGTTGGTGCTTAGACCCAGCAACCTACCGAGGGGGTACCCGAGGTAGTGT
P-SETit.Rcc3-1:1:1	TGTGGTGGGGCTCGTCGAAGATCAGGAACCTTGAAGGTGAACCTCGAACACACGATTTAGAC
P-SETit.Rcc3-1:1:10	TGTGGTGGGGCTCGTCGAAGATCAGGAACCTTGAAGGTGAACCTCGAACACACGATTTAGAC
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	TGTGGTGGGGCTCGTCGAAGATCAGGAACCTTGAAGGTGAACCTCGAACACACGATTTAGAC
P-SETit.Rcc3-1:1:1	AAGTTCGGGGCTGCTTAATGCCGCATAATACCCCATGTCAATGTGTGTGGTTGGATTGTATT
P-SETit.Rcc3-1:1:10	AAGTTCGGGGCTGCTTAATGCCGCATAATACCCCATGTCAATGTGTGTGGTTGGATTGTATT
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	AAGTTCGGGGCTGCTTAATGCCGCATAATACCCCATGTCAATGTGTGTGGTTGGATTGTATT
P-SETit.Rcc3-1:1:1	GATTGATCAGATAATTTGAGGGGGCCCTGCCTCGCCTTATATTGCCCATTGCCGGAGGCA
P-SETit.Rcc3-1:1:10	GATTGATCAGATAATTTGAGGGGGCCCTGCCTCGCCTTATATTGCCCATTGCCGGAGGCA
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	GATTGATCAGATAATTTGAGGGGGCCCTGCCTCGCCTTATATTGCCCATTGCCGGAGGCA

FIG. 10b

P-SETit.Rcc3-1:1:1	GGGCTACAGGTCGGTTGTTGTACAAGAGTACTAGTCGGTTTTTGACCAGCGAGTCCTACTC
P-SETit.Rcc3-1:1:10	GGGCTACAGGTCGGTTGTTGTACAAGAGTACTAGTCGGTTTTTGACCAGCGAGTCCTACTC
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	GGGCTACAGGTCGGTTGTTGTACAAGAGTACTAGTCGGTTTTTGACCAGCGAGTCCTACTC
P-SETit.Rcc3-1:1:1	TAAATTGCTACAAGTAGTTTCCCTAATCCTTGACTAGTCCTTGTCCGCCACGTAGACCACGA
P-SETit.Rcc3-1:1:10	TAAATTGCTACAAGTAGTTTCCCTAATCCTTGACTAGTCCTTGTCCGCCACGTAGACCACGA
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	TAAATTGCTACAAGTAGTTTCCCTAATCCTTGACTAGTCCTTGTCCGCCACGTAGACCACGA
P-SETit.Rcc3-1:1:1	CGTCTTGCCACCTAGTCTCTGTGTTTGATACATCTTGGGTACAGTCCGATATTGTAGGAC
P-SETit.Rcc3-1:1:10	CGTCTTGCCACCTAGTCTCTGTGTTTGATACATCTTGGGTACAGTCCGATATTGTAGGAC
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	CGTCTTGCCACCTAGTCTCTGTGTTTGATACATCTTGGGTACAGTCCGATATTGTAGGAC
P-SETit.Rcc3-1:1:1	TATCCAAGCTTCCCAGTAGGCCCATAGATGTATGGCCGACAACTGGATAATGTAACTCTG
P-SETit.Rcc3-1:1:10	TATCCAAGCTTCCCAGTAGGCCCATAGATGTATGGCCGACAACTGGATAATGTAACTCTG
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	TATCCAAGCTTCCCAGTAGGCCCATAGATGTATGGCCGACAACTGGATAATGTAACTCTG
P-SETit.Rcc3-1:1:1	GGTCAGTACTATCCTTATCTATATAGACACAAACAACGTAATAAGCT
P-SETit.Rcc3-1:1:10	GGTCAGTACTATCCTTATCTATATAGACACAAACAACGTAATAAGCT
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	GGTCAGTACTATCCTTATCTATATAGACACAAACAACGTAATAAGCT
P-SETit.Rcc3-1:1:1	CGTAACCCACCAATATTTGGTGGCATAGACCACGTAATTGCTGATATAGTCTCGTAACCC
P-SETit.Rcc3-1:1:10	CGTAACCCACCAATATTTGGTGGCATAGACCACGTAATTGCTGATATAGTCTCGTAACCC
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	CGTAACCCACCAATATTTGGTGGCATAGACCACGTAATTGCTGATATAGTCTCGTAACCC

FIG. 10c

P-SETit.Rcc3-1:1:1	ACCAATAATTTTCGTGGCATAGAGATCTCTTAGGCAATAAAATTAGCAGTACGAAACAATCTA
P-SETit.Rcc3-1:1:10	ACCAATAATTTTCGTGGCATAGAGATCTCTTAGGCAATAAAATTAGCAGTACGAAACAATCTA
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----
P-SETit.Rcc3-1:1:16	ACCAATAATTTTCGTGGCATAGAGATCTCTTAGGCAATAAAATTAGCAGTACGAAACAATCTA
P-SETit.Rcc3-1:1:1	TGTCACCGTGTGCTAATAACAAATGTTCTAAACCTTACAGCCTACTGGACAGTTCTCTAGC
P-SETit.Rcc3-1:1:10	TGTCACCGTGTGCTAATAACAAATGTTCTAAACCTTACAGCCTACTGGACAGTTCTCTAGC
P-SETit.Rcc3-1:1:11	-----GTGTTGCTAATAACAAATGTTCTAAACCTTACAGCCTACTGGACAGTTCTCTAGC
P-SETit.Rcc3-1:1:16	TGTCACCGTGTGCTAATAACAAATGTTCTAAACCTTACAGCCTACTGGACAGTTCTCTAGC

P-SETit.Rcc3-1:1:1	CATGATACATGTGCATGTCCGAACAAATATTTATGGGTACCCGAAAGGTTAAATTTTGT
P-SETit.Rcc3-1:1:10	CATGATACATGTGCATGTCCGAACAAATATTTATGGGTACCCGAAAGGTTAAATTTTGT
P-SETit.Rcc3-1:1:11	CATGATACATGTGCATGTCCGAACAAATATTTATGGGTACCCGAAAGGTTAAATTTTGT
P-SETit.Rcc3-1:1:16	CATGATACATGTGCATGTCCGAACAAATATTTATGGGTACCCGAAAGGTTAAATTTTGT

P-SETit.Rcc3-1:1:1	AGTATTTATGAGGGGAGGGGGCGTTGACGAAAAAAATAACTTAGCTAAGCGTAATTGG
P-SETit.Rcc3-1:1:10	AGTATTTATGAGGGGAGGGGGCGTTGACGAAAAAAATAACTTAGCTAAGCGTAATTGG
P-SETit.Rcc3-1:1:11	AGTATTTATGAGGGGAGGGGGCGTTGACGAAAAAAATAACTTAGCTAAGCGTAATTGG
P-SETit.Rcc3-1:1:16	AGTATTTATGAGGGGAGGGGGCGTTGACGAAAAAAATAACTTAGCTAAGCGTAATTGG

P-SETit.Rcc3-1:1:1	CTTAAAAACATACAATGTTGTTCCAGCATCAAGCCTACGTGATCATTTACAAAAACCAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:10	CTTAAAAACATACAATGTTGTTCCAGCATCAAGCCTACGTGATCATTTACAAAAACCAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:11	CTTAAAAACATACAATGTTGTTCCAGCATCAAGCCTACGTGATCATTTACAAAAACCAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:16	CTTAAAAACATACAATGTTGTTCCAGCATCAAGCCTACGTGATCATTTACAAAAACCAAC

P-SETit.Rcc3-1:1:1	TCAAAAGATAGGTGTCATGTTCCCTTTTAGTGCAAAACTTAAGGACACCTACCTTGCAAAA
P-SETit.Rcc3-1:1:10	TCAAAAGATAGGTGTCATGTTCCCTTTTAGTGCAAAACTTAAGGACACCTACCTTGCAAAA
P-SETit.Rcc3-1:1:11	TCAAAAGATAGGTGTCATGTTCCCTTTTAGTGCAAAACTTAAGGACACCTACCTTGCAAAA
P-SETit.Rcc3-1:1:16	TCAAAAGATAGGTGTCATGTTCCCTTTTAGTGCAAAACTTAAGGACACCTACCTTGCAAAA

FIG. 10d

P-SETit.Rcc3-1:1:1	CTTAGCTTTGTTACCCAGAAATGAACCGCTAAGCTCGAGGAGCTCTGAACCTTACATGACCA
P-SETit.Rcc3-1:1:10	CTTAGCTTTGTTACCCAGAAATGAACCGCTAAGCTCGAGGAGCTCTGAACCTTACATGACCA
P-SETit.Rcc3-1:1:11	CTTAGCTTTGTTACCCAGAAATGAACCGCTAAGCTCGAGGAGCTCTGAACCTTACATGACCA
P-SETit.Rcc3-1:1:16	CTTAGCTTTGTTACCCAGAAATGAACCGCTAAGCTCGAGGAGCTCTGAACCTTACATGACCA

P-SETit.Rcc3-1:1:1	AATATATTAAACACAAAAGTCATGCATGATTTTCTTTTAAAGTATCGAGCAATATGGTT
P-SETit.Rcc3-1:1:10	AATATATTAAACACAAAAGTCATGCATGATTTTCTTTTAAAGTATCGAGCAATATGGTT
P-SETit.Rcc3-1:1:11	AATATATTAAACACAAAAGTCATGCATGATTTTCTTTTAAAGTATCGAGCAATATGGTT
P-SETit.Rcc3-1:1:16	AATATATTAAACACAAAAGTCATGCATGATTTTCTTTTAAAGTATCGAGCAATATGGTT

P-SETit.Rcc3-1:1:1	CGGGTGICTTTTCGTCTCATACCTCTATTGTGCTCCGTGATCAACAAGGGTGGATCCGGGT
P-SETit.Rcc3-1:1:10	CGGGTGICTTTTCGTCTCATACCTCTATTGTGCTCCGTGATCAACAAGGGTGGATCCGGGT
P-SETit.Rcc3-1:1:11	CGGGTGICTTTTCGTCTCATACCTCTATTGTGCTCCGTGATCAACAAGGGTGGATCCGGGT
P-SETit.Rcc3-1:1:16	CGGGTGICTTTTCGTCTCATACCTCTATTGTGCTCCGTGATCAACAAGGGTGGATCCGGGT

P-SETit.Rcc3-1:1:1	GGTGCAAGGGGGCTCAAGCCCCCCTACCTCTCCCAAAGGAGAAAGGAGAGAAAAGT
P-SETit.Rcc3-1:1:10	GGTGCAAGGGGGCTCAAGCCCCCCTACCTCTCCCAAAGGAGAAAGGAGAGAAAAGT
P-SETit.Rcc3-1:1:11	GGTGCAAGGGGGCTCAAGCCCCCCTACCTCTCCCAAAGGAGAAAGGAGAGAAAAGT
P-SETit.Rcc3-1:1:16	GGTGCAAGGGGGCTCAAGCCCCCCTACCTCTCCCAAAGGAGAAAGGAGAGAAAAGT

P-SETit.Rcc3-1:1:1	GAAGGAAGAAGAAACCCCTATATTCTAATGCTACCTCCGCCACTGCTGATCAACACAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:10	GAAGGAAGAAGAAACCCCTATATTCTAATGCTACCTCCGCCACTGCTGATCAACACAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:11	GAAGGAAGAAGAAACCCCTATATTCTAATGCTACCTCCGCCACTGCTGATCAACACAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:16	GAAGGAAGAAGAAACCCCTATATTCTAATGCTACCTCCGCCACTGCTGATCAACACAAC

P-SETit.Rcc3-1:1:1	ATTCTTAAACCATTTCCTTGGCATTTGGGCATGTTACAAGGTACAAAAGAGCCAGCCCCA
P-SETit.Rcc3-1:1:10	ATTCTTAAACCATTTCCTTGGCATTTGGGCATGTTACAAGGTACAAAAGAGCCAGCCCCA
P-SETit.Rcc3-1:1:11	ATTCTTAAACCATTTCCTTGGCATTTGGGCATGTTACAAGGTACAAAAGAGCCAGCCCCA
P-SETit.Rcc3-1:1:16	ATTCTTAAACCATTTCCTTGGCATTTGGGCATGTTACAAGGTACAAAAGAGCCAGCCCCA

FIG. 10e

P-SETit.Rcc3-1:1:1	TATGCCAAGTTACTAAACTAAACTATGATCCACCATGGAGCGAGAACAAACGTCACACAGG
P-SETit.Rcc3-1:1:10	TATGCCAAGTTACTAAACTAAACTATGATCCACCATGGAGCGAGAACAAACGTCACACAGG
P-SETit.Rcc3-1:1:11	TATGCCAAGTTACTAAACTAAACTATGATCCACCATGGAGCGAGAACAAACGTCACACAGG
P-SETit.Rcc3-1:1:16	TATGCCAAGTTACTAAACTAAACTATGATCCACCATGGAGCGAGAACAAACGTCACACAGG

P-SETit.Rcc3-1:1:1	CATCAACCAATGCAGCAATCTTGATCGCTAGTACTGTCGGGCATTATATCTGAAACAAAT
P-SETit.Rcc3-1:1:10	CATCAACCAATGCAGCAATCTTGATCGCTAGTACTGTCGGGCATTATATCTGAAACAAAT
P-SETit.Rcc3-1:1:11	CATCAACCAATGCAGCAATCTTGATCGCTAGTACTGTCGGGCATTATATCTGAAACAAAT
P-SETit.Rcc3-1:1:16	CATCAACCAATGCAGCAATCTTGATCGCTAGTACTGTCGGGCATTATATCTGAAACAAAT

P-SETit.Rcc3-1:1:1	CCAGATCACCCATCTCATCACAGTCACATGCATTTCATGGTCAACGGGAACCGTTAGCAAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:10	CCAGATCACCCATCTCATCACAGTCACATGCATTTCATGGTCAACGGGAACCGTTAGCAAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:11	CCAGATCACCCATCTCATCACAGTCACATGCATTTCATGGTCAACGGGAACCGTTAGCAAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:16	CCAGATCACCCATCTCATCACAGTCACATGCATTTCATGGTCAACGGGAACCGTTAGCAAAC

P-SETit.Rcc3-1:1:1	CACCAACTAATCAGCATTGCAACACTCTTCCCTCCTATAAAATGCAGCGGGGGACACC
P-SETit.Rcc3-1:1:10	CACCAACTAATCAGCATTGCAACACTCTTCCCTCCTATAAAATGCAGCGGGGGACACC
P-SETit.Rcc3-1:1:11	CACCAACTAATCAGCATTGCAACACTCTTCCCTCCTATAAAATGCAGCGGGGGACACC
P-SETit.Rcc3-1:1:16	CACCAACTAATCAGCATTGCAACACTCTTCCCTCCTATAAAATGCAGCGGGGGACACC

P-SETit.Rcc3-1:1:1	ATAAACCATCACAGGCACTTAG
P-SETit.Rcc3-1:1:10	ATAAACCATCACAGGCACTTAG
P-SETit.Rcc3-1:1:11	ATAAACCATCACAGGCACTTAG
P-SETit.Rcc3-1:1:16	ATAAACCATCACAGGCACTTAG

FIG. 10f

P-SETit.Ssp1-1:1:1	TTGCCCTTACTATAGGCACGCGTGGTCTGACGGCCCGGGCTGGTATTCTACTGACCCAC
P-SETit.Ssp1-1:1:2	-----
P-SETit.Ssp1-1:1:1	GGTTCACCTCGTATGTTATCCATCCAGCTCAATTTTTCACGGATACCGCAAGCTTAACAGT
P-SETit.Ssp1-1:1:2	-----
P-SETit.Ssp1-1:1:1	GGGTGACTGTGTAGGTGATCACTTGGATTTTGGGGTGAGCACCTTGAGTCCACCCACAAA
P-SETit.Ssp1-1:1:2	-----
P-SETit.Ssp1-1:1:1	GGGTCTTATTATGCCAGTCTCAATAGTGGATTTCAATGTGAGTTTCATTAGCAATAAATTC
P-SETit.Ssp1-1:1:2	-----
P-SETit.Ssp1-1:1:1	TATGGTACATTAGCAAATTTTGCTAACTTGGCAGGATTATTAAAGAGAGAGAGAAAGTTTC
P-SETit.Ssp1-1:1:2	-----
P-SETit.Ssp1-1:1:1	ATTAGATGAGAGAGCAATTTTCATCCCCATAAAACCCATCAGACTCAGTGCAATGAAACTG
P-SETit.Ssp1-1:1:2	-----
P-SETit.Ssp1-1:1:1	TGCACGGAGATTGGCCTTAGAGGCTCTTGAAATCACAATCGACCCGCTTTCCTACTGAAAA
P-SETit.Ssp1-1:1:2	-----
P-SETit.Ssp1-1:1:1	TTCTCCAGAATGCACGCTATCAGAAGAGAGGCTCTAGTACCGTGGTTCGACTCTCCGTG
P-SETit.Ssp1-1:1:2	-----
P-SETit.Ssp1-1:1:1	GGAGCAAATTAAAGTGATCTAGAAATAAAAAAATGTACAAAAAATAGGTGGGTTTCTCCT
P-SETit.Ssp1-1:1:2	-----
P-SETit.Ssp1-1:1:1	ACTAACTTCAGTCAAAAAAAGATAGCTAAACAAGATAGCTCTTGC GTTGAGTGATGGA
P-SETit.Ssp1-1:1:2	-----
P-SETit.Ssp1-1:1:1	TAAATTGAGTTGGCCCGCCAGCTGCCCTTCCCTTTCTTAGATTAGTTTGGGGTCTTTTC
P-SETit.Ssp1-1:1:2	-----GGTTCTTTTC *****

FIG. 11a

FIG. 11b

P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	GACTTTTCACGCTGAGAAACTGTCAGGAAGCTCAAAACAAACACAGCCTATACAGTGATTTC
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	TGTACCAATCAAAACCACTCACAAACTCACCAATGTACCTGTGTTAATTTTCCAAATCAACCAT
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	TGCTGTGGGGCTTGTTGGGTTATGACTTAAGAGTATGAGCAGTATTTTCCCCCCTGGAAATG
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	CAAGTGGCAGATAGCTTCTGAGATCTACCATGCACCCCTGGTAAAGCTCCTACCAATTTTAT
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	TTGCAATAGTAGATGCATATAATTGATGGACACAGAGTTCTGAACCGTGAGATTTTCTTTT
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	AACTTCAGAGTTCTGTCACTATGTTAACGTGGATCTGGAGTTTTTGCAGGAAGTGTGAAGA
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	AGGAACCGTACCTAAAACTAAAAGTCTCACGAAGACCAAAATGGGCAAGCCAGACAGTCAG
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	AGAGACAGGGCTTCTTCGGCCCAACTGGACAAGGGATGTGCCATCATGTGCTGAGAGATTAT
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	CCAAATCCGCAATTTGCAGACGTGCCCTTCTCAATCAGTTTGCACAAAGCGATAAAGGTAAA
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	CAACCATTTGGAGCAATTGTTAACAGCAGCCCTAGCATGGCAGGATGCGTCATCTGAATAATG
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	CGGAGGGCAGGACAGTAGGACAGGACACCTAATCCCTGCAAATTTCTAGTGGCTCTGGGAC

FIG. 12a

P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	ACTGATCATGGCCCCAAAAGTGCTAACCACTGCATTACTAAAACGTGTGGGTGTTGCGAGT
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	TCCAAAGTTGGCTGTTGTCAIGGAAI GGATATGAAAAATGCAAAAGATTCTCGTTGTTTIGTT
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	GAGAGTTAGTAAATTGGGATGACTTCGGCATGACAAACAGCACAAACCTTACATATTTGGT
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	AAGACTTGCAACAAAAATCAAAAGAAATGCTAGTAGATACCAACAAAAAGAAAAACAGAG
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	CTAGCATGAACACACTTCTTTGATCACAGTTGATCAAAAGGTGTA TGCCCTCAGACAAAGCT
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	GTGATGATGGTCAAAACACTTTTGTCTACCGAATATCGCAGTTGTCCTTTTGGTACATTAC
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	AAGTTTGATCTTTATCATCATCACCATCAGAAGTTCAGAAAAGTCTCGATGAAAAACAATGGAAA
P-SETit.Tip-1:1:1	-----
P-SETit.Tip-1:1:4	TGAATACTGCTTACTTAGCTCAAAATTCATATTCCGTTGTTACAGGATACTTAAAAAAGGT
P-SETit.Tip-1:1:1	-----TGTACTGTC
P-SETit.Tip-1:1:4	ACCAAAGGCTGTTCCCTAA TCATACGCTGAAGTCGTTGCCACCAATGGCAGCTGTACTGTC

P-SETit.Tip-1:1:1	ATATTGTCGTGGTTTTTCAATTGCTGTACCTGATGCAAAACGTAATGGGTTTACTAAATCTT
P-SETit.Tip-1:1:4	ATATTGTCGTGGTTTTTCAATTGCTGTACCTGATGCAAAACGTAATGGGTTTACTAAATCTT

FIG. 12b

P-SETit.Tip-1:1:1 GCACCCGCCGGCTTCAAAATGAAGAGTGCTAATTTGGTCCACGTACCATCACCGGTTTCG
P-SETit.Tip-1:1:4 GCACCCGCCGGACTTCAAAATGAAGAGTGCTAATTTGGTCCACGTACCATCACCGGTTTCG

P-SETit.Tip-1:1:1 AACTGTCTAGAAATGGCAGGCAAAAGATGATTGGACAGGCGATGCAGGGAAGAGCACCCGT
P-SETit.Tip-1:1:4 AACTGTCTAGAAATGGCAGGCAAAAGATGATTGGACAGGCGATGCAGGGAAGAGCACCCGA

P-SETit.Tip-1:1:1 TGACGATGATGCGAGTTCCCAACCATTCGAGCAATGATTATCAGCCACACGACTTACTC
P-SETit.Tip-1:1:4 TGACGATGATGCGAGTTCCCAACCATTCGAGCAATGATTATCAGCCACACGACTTACTC

P-SETit.Tip-1:1:1 TTCAGAGCTAACCACTGCCATGCAGAGAAAAAGTGAAATCATATTGTCATGATCTACAACG
P-SETit.Tip-1:1:4 TTCAGAGCTAACCACTGCCATGCAGAGAAAAAGTGAAATCATATTGTCATGATCTACAACG

P-SETit.Tip-1:1:1 AAGTGAACAATCAGGCGATGCTAAAGTGCTGAAACTTTACTGATCTCTCATGTTGGACAA
P-SETit.Tip-1:1:4 AAGTGAACAATCAGGCGATGCTAAAGTGCTGAAACTTTACTGATCTCTCATGTTGGACAA

P-SETit.Tip-1:1:1 CAAAGAAATACGGGAATACATCAGCAACGCAACTCTTGAGCTTTGCTTGCAGGAAATGACCAG
P-SETit.Tip-1:1:4 CAAAGAAATACGGGAATACATCAGCAACGCAACTCTTGAGCTTTGCTTGTGAAATGACCAG

P-SETit.Tip-1:1:1 CTAGAAATTTCCAAGCATTTACAGAAACATGACTTTAAGTTTCAGAAAAACAATAACAAGG
P-SETit.Tip-1:1:4 CTAGAAATTTCCAAGCATTTACAGAAACATGACTTTAAGTTTCAGAAAAACAATAACAAGG

P-SETit.Tip-1:1:1 CCACTAAATAAGCGTGGGGATAACATATCCTCCAGATGACAGGCAATCTGCAACTTGCAG
P-SETit.Tip-1:1:4 CCACTAAATAAGCGTGGGGATAACATATCCTCCAGATGACAGGCAATCTGCAACTTGCAG

P-SETit.Tip-1:1:1 CCATTCAAATGTACGATTAAACAAAATATTTAAGCGCCACATGAGATAATATATCCTCCAA
P-SETit.Tip-1:1:4 CCATTCAAATGTACGATTAAACAAAATATTTAAGCGCTACATGAGATAATATATCCTCCAA

FIG. 12c

P-SETit.Tip-1:1:1	TTAGGGCCTTTAGTATTGTCAATTAGCTCATAAACCATGGTGCACTCCTCACATGGACGCTGC
P-SETit.Tip-1:1:4	TTAGGGCCTTTAGTATTGTCAATTAGCTCATAAACCATGGTGCACTCCTCACATGGACGCTGC

P-SETit.Tip-1:1:1	ATAAGAAAGTTCATATAAGCAACAGACATATGAACAAAAGCATGGTGGCCTGCCCGGCCGG
P-SETit.Tip-1:1:4	ATAAGAAAGTTCATATAAGCAACAGACATATGAACAAAAGCATGGTGGCCTGCCCGGCCGG

P-SETit.Tip-1:1:1	ACTAGCTAGTACTACCAATCATGGAAATAAGCTAGTACCCTAAATGAAATTAATAATGGTTT
P-SETit.Tip-1:1:4	ACTAGCTAGTACTACCAATCATGGAAATAAGCTAGTACCCTAAATGAAATTAATAATGGTTT

P-SETit.Tip-1:1:1	TTAGCGATTATCCACGCCGTCCAGAACTACTCTAATCCACAAGTTGAGGCCGCCCATGAAG
P-SETit.Tip-1:1:4	TTAGCGATTATCCACGCCGTCCAGAACTACTCTAATCCACAAGTTGAGGCCGCCCATGAAG

P-SETit.Tip-1:1:1	CCGCGAGAGGGCGACGCCATGTGTATAAAAGGGGCCCTAAGCTGAGTGGACTTGCTGCATC
P-SETit.Tip-1:1:4	CCGCGAGAGGGCGACGCCATGTGTATAAAAGGGGCCCTAAGCTGAGTGGACTTGCTGCATC

P-SETit.Tip-1:1:1	AGATTAGT
P-SETit.Tip-1:1:4	AGATTAGT

FIG. 12d

P-SETit.TubA2-1-1-1:1:2	TAGCGTAGCAGGCTAGCAGCCCTGAACCTCTCGGGTGATTCTGTGGCGAGTTAGCTTGCTCG
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:3	-----
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:2	CTGCCCTGCAATGGAGTGAATATTGGCAGTACGAAAGTCACACGGGCAGGCAGAGATTGGA
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:3	-----
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:2	ACATGGTGGAAACAAGAACCATCGGCATCGTTCTTCTGATCAATATAGTGATTACTGGAA
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:3	-----
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:2	GAAATCAAGAACAGAAATAAAACCAAGGCATCCTGGATCTACCATGTCAATCTTTTGCTTTCA
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:3	-----
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:2	TCCTCGTCGTTTGGAGCGAGCCTGTTCTTGTTTGAGGCGCGCTCGACCGTGCCACGAAAGT
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:3	-----
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:2	AACAGGTGCAATGAGGTCTGCAGTCTGCACCTAGAACTTCCCAGCTCCCAAATTC AACGAAA
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:3	-----
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:2	CTGAAAAAAGTCATTGGTAACATCAAAAGTCTTGTCTTAGGATAGCTGCTGTTCTTGACGC
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:3	-----
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:2	TGGTTAGATTGTCCAATAAAATTACATGACCAGCGCACATGTACTTGGTATTCGACTTGA
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:3	-----
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:2	TGATTTGTATGTACTGACGGACTTGAATAAAGTAGGGGGAATTAGGACTCAGAAGTCTAC
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:3	-----
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:2	GATTTTGGTCCAATATTGATTGTGATGTTCAAAGTCGACGTCTCTTTTCGAGACGAAAT
P-SETit.TubA2-1-1-1:1:3	-----

FIG. 13a

P-SETit.TubA2-1-1:1:2	TGTGATGCGTAGAACAAAAACGACGCAATTTCCTTTCAAAGAAAAAGATTAGGGGCAGA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3	-----
P-SETit.TubA2-1-1:1:2	ACAATTACAGGATCTGTTTGGCTGGACTTATAAGCCGGCTGAAAAGCTGAAACGGTTGATT
P-SETit.TubA2-1-1:1:3	-----
P-SETit.TubA2-1-1:1:2	TATTGTGAGAGAAAAACACTGTTTGGTGGCTGATAAGCTGAAACGAACAGGCTGTCAGTC
P-SETit.TubA2-1-1:1:3	-----ACTGTTTGGTGGCTGATAAGCTGAAACGAACAGGCTGTCAGTC

P-SETit.TubA2-1-1:1:2	ATTAGGCTGCCGGCTCTGGAACAGTGCGCCCATCAAGAGATCACCCGAACCAATGTTGAGCT
P-SETit.TubA2-1-1:1:3	ATTAGGCTGCCGGCTCTGGAACAGTGCGCCCATCAAGAGATCACCCGAACCAATGTTGAGCT

P-SETit.TubA2-1-1:1:2	CATCAACGTGCGCCGCTGTTGTGCTCATTTGGTGTGCGGTCGTGGCTGGCGGCATCTTT
P-SETit.TubA2-1-1:1:3	CATCAACGTGCGCCGCTGTTGTGCTCATTTGGTGTGCGGTCGTGGCTGGCGGCATCTTT

P-SETit.TubA2-1-1:1:2	CGTTGCGTCTTGTCAITGGATTATCCACGACGGCAGTGTCTGTTTATGATGACGGCA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3	CGTTGCGTCTTGTCAITGGATTATCCACGACGGCAGTGTCTGTTTATGATGACGGCA

P-SETit.TubA2-1-1:1:2	CTTGATTCGCCCATGGATGGTGAACGAAATCGAAGTCCGGTCATTTTTATTATTACCAG
P-SETit.TubA2-1-1:1:3	CTTGATTCGCCCATGGATGGTGAACGAAATCGAAGTCCGGTCATTTTTATTATTACCAG

P-SETit.TubA2-1-1:1:2	ATGACGTGGTTGGTGACCTGAGAGGAACAGACATGAGAAGATGAGATCAGCAGCTCAATT
P-SETit.TubA2-1-1:1:3	ATGACGTGGTTGGTGACCTGAGAGGAACAGACATGAGAAGATGAGATCAGCAGCTCAATT

FIG. 13b

P-SETit. TubA2-1-1:1:2	CCCACATTGACAGACGACCTTTGGAGCAGTACAAGAGACCCAAATGAAGAATAGTGCAAA
P-SETit. TubA2-1-1:1:3	CCCACATTGACAGACGACCTTTGGAGCAGTACAAGAGACCCAAATGAAGAATAGTGCAAA

P-SETit. TubA2-1-1:1:2	TTACAGAGTATATTAGAACACGAGAATTATTAAGTTTACTCGAGGTCATGAAAGAATT
P-SETit. TubA2-1-1:1:3	TTACAGAGTATATTAGAACACGAGAATTATTAAGTTTACTCGAGGTCATGAAAGAATT

P-SETit. TubA2-1-1:1:2	TAGGACTATTGAGAGCACAGGCTGTGTTCAAGTCCCTGCATGAACCAGAGAAAAGTTCCCAC
P-SETit. TubA2-1-1:1:3	TAGGACTATTGAGAGCACAGGCTGTGTTCAAGTCCCTGCATGAACCAGAGAAAAGTTCCCAC

P-SETit. TubA2-1-1:1:2	CAAGGCCCTCCATCAGAGGAACGAATTTGCCCTGGAACTCCATCACTCACCAGTCACCACTC
P-SETit. TubA2-1-1:1:3	CAAGGCCCTCCATCAGAGGAACGAATTTGCCCTGGAACTCCATCACTCACCAGTCACCACTC

P-SETit. TubA2-1-1:1:2	ACCACCTTACCAGCCTAATAAAGCGTAGCAGACAAATTTGGAGTAGACGATCATGTGCA
P-SETit. TubA2-1-1:1:3	ACCACCTTACCAGCCTAATAAAGCGTAGCAGACAAATTTGGAGTAGACGATCATGTGCA

P-SETit. TubA2-1-1:1:2	GTCTCATAGGCCCTCTTCTAGGAATAACCGTATTTGATAGCCAATCCACCTATGTGGTGA
P-SETit. TubA2-1-1:1:3	GTCTCATAGGCCCTCTTCTAGGAATAACCGTATTTGATAGCCAATCCACCTATGTGGTGA

FIG. 13c

P-SETit.TubA2-1-1:1:2	TTTTTTTTTCCCTTTGTCCATCGGGGTCGCTTTCCATCCGACGTGTCTGCAGTGTAGCGCA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3	TTTTTTTTTCCCTTTGTCCATCGGGGTCGCTTTCCATCCGACGTGTCTGCAGTGTAGCGCA

P-SETit.TubA2-1-1:1:2	ATCCATCTGTCGCTTTCTGCTTTCTGATGAACGTTCCGGTTGACGCCGCTAAGCTGCCCTT
P-SETit.TubA2-1-1:1:3	ATCCATCTGTCGCTTTCTGCTTTCTGATGAACGTTCCGGTTGACGCCGCTAAGCTGCCCTT

P-SETit.TubA2-1-1:1:2	GTCCCTCCCTTTTCTCCCGTCTGCACAGGGAGGGG
P-SETit.TubA2-1-1:1:3	GTCCCTCCCTTTTCTCCCGTCTGCACAGGGAGGGG

FIG. 13d

P-SETit.Ubq1-1:1:1	ACTGCCGCGACAGCCTCACTGGCGGGAGGGCTCCGAGCGCTCTCTCCCCGGCGCCGGC
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----
P-SETit.Ubq1-1:1:1	GGAGCAGCGATCTGGAATTGGAGAGAAATAGAGGAAAGAGAGGAAAGAGAGATAGCG
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----
P-SETit.Ubq1-1:1:1	CAAAGAGCTGAAAAGATAAGGTTGTGCGGGCTGTGGTGAATTAGAGGACCACTAATCCCTC
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----
P-SETit.Ubq1-1:1:1	CATCTCCTAATGACGCGGTGCCCAAGACCAGTGCCGCGGCACACACAGCGTCTAAGTGAAC
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----
P-SETit.Ubq1-1:1:1	TTCCGCTAAACCTTCCGGTCATTGCGCCTGAAAGATGTCATGTGGCAGGCCCCCTCTCA
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----
P-SETit.Ubq1-1:1:1	GTAGATTGCCAACTGCCTACCGTGCCACTCTTCCATGCAATGATTGCTCCCGTCTATCCCG
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----
P-SETit.Ubq1-1:1:1	TTTCTCACAAACAGATAGACAACAGTAAGCATCACTAAAGCAAGCATGTGTAGAACCCTAA
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----
P-SETit.Ubq1-1:1:1	AAAAAGGCTTATACTACCAGTATACTATCAACCAGCATGCCGTTTTTGAAAGTATCCAGGA
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----
P-SETit.Ubq1-1:1:1	TTAGAAGCTTCTACTGCGCTTTTATATTATAGCTGTGGACCTGTGGTAACCTTTCTCTTT
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----
P-SETit.Ubq1-1:1:1	TGGCGCTTGCTTAATCTCGGCCGTGCTGGTCCATGCTTAGGCACTAGGCAGAGATAGAGC
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----
P-SETit.Ubq1-1:1:1	CGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTCGAGGGGCCGTGGGCTGGTTTCCACTAGC
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----

FIG. 14a

P-SETit.Ubq1-1:1:1	CTACAGCTGTGCCACGTGCGGCCGCGCAAGCCGAAGCAAGCACGCTGAGCCGTTGGACAG
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----
P-SETit.Ubq1-1:1:1	CTTGTCATAATGCCATTACGTGGATTACACGTAACTGGCCCCGTGTAACACTCTCGTTCGGGCC
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----
P-SETit.Ubq1-1:1:1	ATCATCAACGACGACGTCGCTAGGCGACGACACGGGTAATGCACGCAGCCACCCAGGC
P-SETit.Ubq1-1:1:3	-----CAGGGTAATGCACGCAGCCACCCAGGC

P-SETit.Ubq1-1:1:1	GCGCGCGCTAGCGGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTCGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG
P-SETit.Ubq1-1:1:3	GCGCGCGCTAGCGGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTCGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG

P-SETit.Ubq1-1:1:1	GGTTAACGCCAGAAACAGTGTTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAATATTCACACGA
P-SETit.Ubq1-1:1:3	GGTTAACGCCAGAAACAGTGTTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAATATTCACACGA

P-SETit.Ubq1-1:1:1	AAGAAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAAACTCACGCCCGCTA
P-SETit.Ubq1-1:1:3	AAGAAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAAACTCACGCCCGCTA

P-SETit.Ubq1-1:1:1	ACATCCAACGGCCAACAGCTCGACGTGCCGGTCAGCAGAGCATCGGAACACTGGTGATTG
P-SETit.Ubq1-1:1:3	ACATCCAACGGCCAACAGCTCGACGTGCCGGTCAGCAGAGCATCGGAACACTGGTGATTG

FIG. 14b

P-SETit.Ubq1-1:1:1	GTGAGCCGGCAGTATGCGCCCCAGCACGGCCGAGGTGGTGGCCCCGTGGCCCTGCTG
P-SETit.Ubq1-1:1:3	GTGAGCCGGCAGTATGCGCCCCAGCACGGCCGAGGTGGTGGCCCCGTGGCCCTGCTG

P-SETit.Ubq1-1:1:1	TCTGCGGGCTCGGACAACTTGAACTGGGCCACCGCCTCGTCGAACTCGCAACCCCGT
P-SETit.Ubq1-1:1:3	TCTGCGGGCTCGGACAACTTGAACTGGGCCACCGCCTCGTCGAACTCGCAACCCCGT

P-SETit.Ubq1-1:1:1	TGGCGGAAGAAAGGAA TGGCTCGTAGGGCCCCGGGTAGAA TCGAAGAA TGTTCGCTGGG
P-SETit.Ubq1-1:1:3	TGGCGGAAGAAAGGAA TGGCTCGTAGGGCCCCGGGTAGAA TCGAAGAA TGTTCGCTGGG

P-SETit.Ubq1-1:1:1	CTTCGATTACATAACATGGGCCCTGAAGCTCTAAACGACGGCCCCGGTTCGCCGCGGATG
P-SETit.Ubq1-1:1:3	CTTCGATTACATAACATGGGCCCTGAAGCTCTAAACGACGGCCCCGGTTCGCCGCGGATG

P-SETit.Ubq1-1:1:1	GAAAGAGACCGGATCCTCCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACCCG
P-SETit.Ubq1-1:1:3	GAAAGAGACCGGATCCTCCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACCCG

P-SETit.Ubq1-1:1:1	ACGCGGAGGAGTCGTGCGTGGTCCAAACACGGCCGGGGCTGGGCTGCGACCTTAACCAG
P-SETit.Ubq1-1:1:3	ACGCGGAGGAGTCGTGCGTGGTCCAAACACGGCCGGGGCTGGGCTGCGACCTTAACCAG

P-SETit.Ubq1-1:1:1	CAAGGCACGCCACGACCCGCCCGCCCTCGAGGCATAAAATACCCCTCCCATCC
P-SETit.Ubq1-1:1:3	CAAGGCACGCCACGACCCGCCCGCCCTCGAGGCATAAAATACCCCTCCCATCC

FIG. 14c

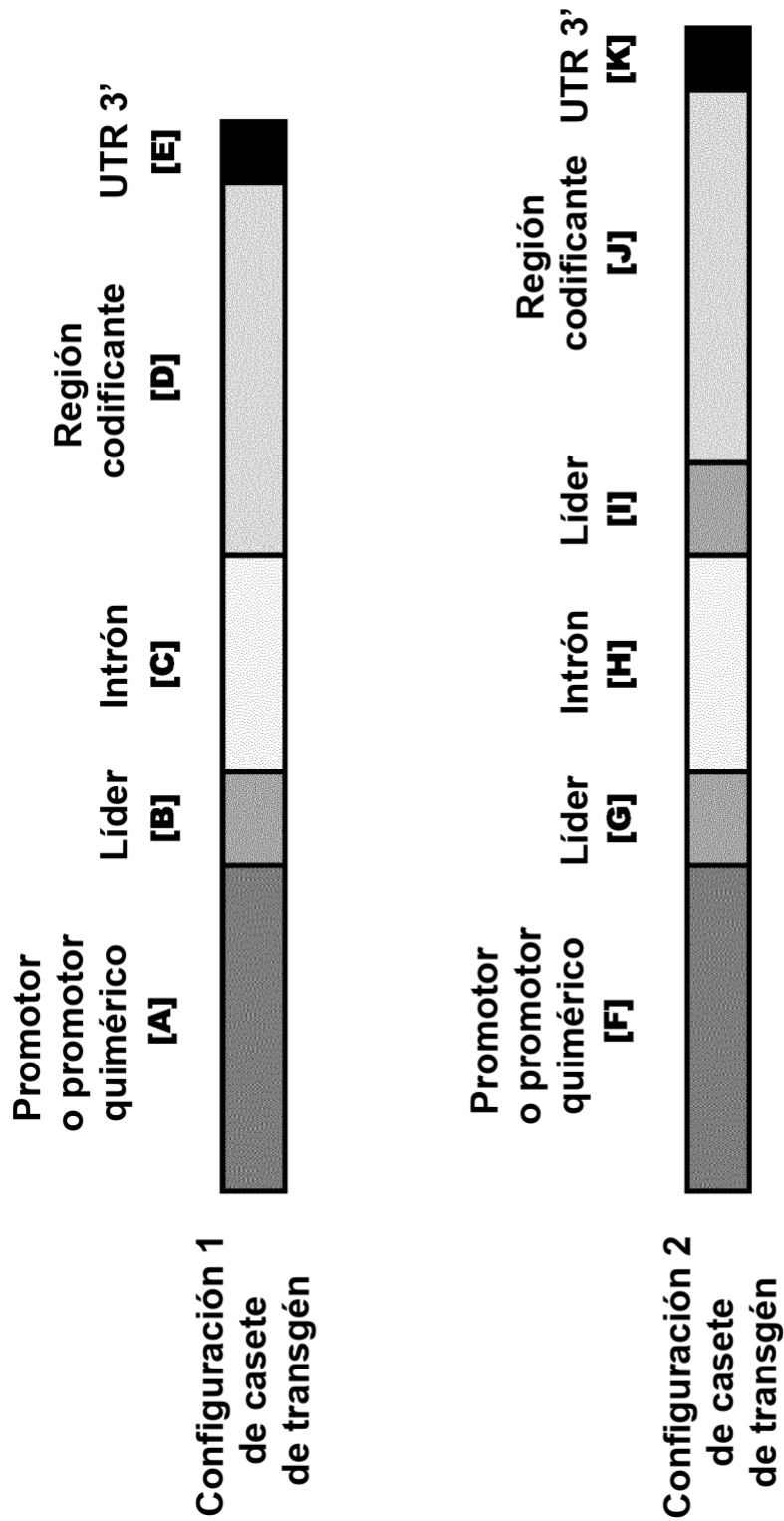


FIG. 15