



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 073**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99910592 .7**  
96 Fecha de presentación : **07.04.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1068311**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2001**

54 Título: **Métodos y medios para obtener fenotipos modificados.**

30 Prioridad: **08.04.1998 US 56767**  
**03.08.1998 US 127735**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.10.2011**

73 Titular/es: **COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND  
INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION**  
**Limestone Avenue**  
**Campbell, ACT 2612, AU**

72 Inventor/es: **Waterhouse, Peter, Michael;**  
**Wang, Ming-Bo y**  
**Graham, Michael, Wayne**

74 Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 073 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

Métodos y medios para obtener fenotipos modificados

5 **1. Campo del invento**

El invento se refiere a métodos para reducir la expresión fenotípica de una secuencia de ácido nucleico de interés en células eucarióticas, particularmente células vegetales, al proporcionar simultáneamente a las células genes quiméricos que codifican moléculas de RNA sentido y antisentido que comprenden secuencias de nucleótidos homólogas y complementarias, respectivamente, con respecto a al menos parte de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de interés. Las moléculas de RNA sentido y antisentido se proporcionan como una molécula de RNA, en que los RNA sentido y antisentido pueden estar enlazados por una secuencia nucleotídica espaciadora y son capaces de formar una molécula de RNA de cadena doble.

15 En un aspecto del invento, los métodos se dirigen hacia la reducción de una infección vírica, para dar lugar a una resistencia extrema a virus. En otra realización, los métodos se dirigen hacia la reducción de la expresión fenotípica de un gen endógeno en una célula vegetal. El invento se refiere además a métodos de exploración de alto rendimiento para identificar el fenotipo proporcionado por el ácido nucleico de interés a células vegetales. También se proporcionan células vegetales que comprenden dichas moléculas de RNA, así como plantas que consisten esencialmente en dichas células vegetales.

2. **Fundamento del invento**

25 En 1985, Sanford y Johnston propusieron el concepto de resistencia derivada de parásitos. Propusieron como postulado que productos génicos clave de un parásito expresados en el huésped en una forma disfuncional, en exceso o en una fase de desarrollo errónea, deberían alterar la función del parásito con un efecto mínimo sobre el huésped (Sanford y Johnston, 1985). Utilizando el bacteriófago QB como modelo, propusieron que la expresión, en bacterias, de la proteína de envoltura o la replicasa modificada del bacteriófago o de un RNA antisentido complementario del genoma de QB podría proporcionar resistencia. También propusieron que dichos planteamientos serían aplicables, en plantas, a virus vegetales y particularmente al uso de una replicasa modificada de un virus vegetal. La expresión de la proteína de envoltura del virus vegetal, el virus del mosaico del tabaco (TMV; del inglés, tobacco mosaic virus), en el tabaco fue la primera validación práctica de este concepto en cuanto a la resistencia a virus vegetales. Este trabajo (Powell-Abel et al., 1986) mostró que la expresión de la proteína de envoltura del TMV, procedente de un transgén bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV; del inglés, cauliflower mosaic virus), confería resistencia al TMV a las plantas. El mismo grupo (Powell et al., 1990) mostró que las plantas que expresaban mayores niveles de proteína de envoltura eran generalmente más resistentes al TMV que las plantas que expresaban bajos niveles. Desde esta demostración, ha habido muchísimos ejemplos de plantas transformadas con genes de proteínas de envoltura de virus que muestran resistencia (Tabla 1). También ha habido diversos informes sobre resistencia a virus vegetales en plantas que expresan replicasa de tipo silvestre (Braun y Hemenway, 1992; Brederode et al., 1995), replicasa truncada (Carr et al., 1992), replicasa modificada (Longstaff et al., 1993) o RNA vírico antisentido (Kawchuck et al., 1991).

45 En 1992, Dougherty y sus colegas estaban utilizando diferentes formas del gen de la proteína de envoltura del virus del grabado del tabaco (TEV; del inglés, tobacco etch virus) y descubrieron que ciertas plantas que contenían genes de proteína de envoltura "antisentido" y genes de proteína de envoltura "sentido" no traducibles mostraban una resistencia extrema (ER; del inglés, extreme resistance) al virus (Lindbo y Dougherty, 1992 a, b). Esta resistencia era funcional a nivel de la planta completa y a nivel de una sola célula. El TEV era incapaz de replicarse en protoplastos procedentes de plantas ER pero se replicaba con niveles elevados en protoplastos procedentes de tabaco no transgénico. Dougherty et al. concluyeron que el mecanismo que creaba la resistencia extrema para la construcción sentido no traducible no era el mismo que la a menudo presentada estrategia mediada por la proteína de envoltura. Propusieron que el mRNA de la construcción sentido no traducible se estaba hibridando con el genoma sentido menos del virus e interfiriendo con la procesión de complejos de replicación en la cadena menos. Sugirieron que debía evitarse el uso de una secuencia vírica que pudiera formar un apareamiento intramolecular ya que esto interferiría con su capacidad para hibridarse con el RNA vírico diana.

55 **Tabla 1:** Especies vegetales que han sido genéticamente modificadas para resistencia a virus (de Rebecca Grumet, *Hort Science* 30 [3], 1995)

Especie	Virus
<b>Tabaco</b> ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	AIMV, ArMV, CMV, PVX, PVY, TEV, TGMV, TMV, TRV, TSV, TSWV
<b>Otras especies de <i>Nicotiana</i></b> ( <i>N. debneyii</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>N. clevelandii</i> )	ACMV, BYMV, CyMV, CyRSV, BCTV, PEBV, PPV, PVS, WMV
<b>Patata</b> ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	PI, RV, PVY
<b>Tomate</b> ( <i>Lycopersicon esculentum</i> L.)	AIMV, CMV, TMV, TYLCV
<b>Pepino</b> ( <i>Cucumis sativus</i> L.)	CMV

<b>Melón</b> ( <i>Cucumis melo</i> L.)	CMV, ZYMV
<b>Alfalfa</b> ( <i>Medicago sativa</i> L.)	AIMV
<b>Papaya</b> ( <i>Carica papaya</i> L.)	PRSV
<b>Maíz</b> ( <i>Zea mays</i> L.)	MDMV
<b>Arroz</b> ( <i>Oryza sativa</i> L.)	RSV
<b>Colza</b> ( <i>Brassica napus</i> L.)	TYMV

El grupo de Dougherty amplió sus investigaciones a plantas que contenían genes sentido no traducibles de la proteína de envoltura del virus Y de la patata (PVY; del inglés, potato virus Y). Obtuvieron resultados similares a aquellos con el TEV y mostraron que las plantas con ER tenían un elevado número de copias de transgenes, una transcripción muy activa de los transgenes, y bajos niveles de mRNA en estado estacionario procedente del transgén del PVY (Lindbo et al., 1993; Smith et al., 1994). Se propuso el siguiente modelo para este mecanismo de la resistencia: el elevado nivel de transcripción del transgén vírico desencadena un sistema de vigilancia celular postranscripcional, de base citoplásmica, que se dirige a RNAs específicos para su eliminación. Puesto que el transgén codifica un transcrito que comprende secuencias víricas, el mecanismo no sólo degrada el mRNA del transgén sino también las mismas secuencias del RNA genómico vírico. Un punto esencial en este modelo es la necesidad de un elevado nivel de transcripción del transgén, proporcionado por un elevado número de copias (3-8; Goodwin et al., 1996). Alternativamente, el umbral de RNA requerido para que se desencadene el mecanismo puede ser alcanzado por un nivel de transcripción más modesto ayudado por el RNA vírico de la replicación en la primera infección. Esto da lugar a un "fenotipo de recuperación", en el que la planta está inicialmente infectada y muestra síntomas pero luego produce nuevo crecimiento sin síntomas de virus, y que es sumamente resistente a la infección.

Esta propuesta vino corroborada por los hallazgos de que el silenciamiento génico de transgenes no víricos podía ser también debido a un mecanismo postranscripcional (Ingelbrecht et al., 1994; de Carvalho Niebel et al., 1995) que funcionaba a nivel de RNA.

Se obtuvo un vínculo entre silenciamiento de genes no víricos y esta resistencia derivada de patógenos al inocular un virus que contenía secuencias de GUS en plantas transgénicas en las que se sabía que un transgén GUS estaba silenciado por un mecanismo postranscripcional (English et al., 1996). En esta situación, las plantas eran muy resistentes a la infección vírica. Sin embargo, las mismas plantas eran susceptibles al virus si no contenían secuencias de GUS.

El grado de resistencia vírica no está siempre directamente relacionado con el nivel de transcripción de transgenes víricos (Mueller et al., 1995; English et al., 1996), lo que sugiere que puede haber un mecanismo alternativo para inducir la resistencia. Para acomodar estas discrepancias, se ha propuesto un modelo alternativo en que el factor crucial que afecta a la resistencia no es el nivel sino la calidad del mRNA transgénico (English et al., 1996). De acuerdo con este modelo, el transgén sólo puede inducir resistencia (o silenciamiento génico) si es transcrito para producir RNA "aberrante". Ha habido muchos ejemplos de silenciamiento génico postranscripcional y metilación del transgén (Hobbs et al., 1990; Ingelbrecht et al., 1994), y se ha hallado también que la metilación del transgén está asociada en algunos casos de resistencia vírica extrema (Smith et al., 1994; English, 1996). En el modelo propuesto, la metilación del transgén conduce a la producción de RNAs aberrantes que inducen el sistema citoplásmico de vigilancia de RNA. Baulcombe y English han sugerido que este método de inducción puede ser el mismo que el hallado para el silenciamiento de *met2* en *A. immersus*. En este sistema, la transcripción del RNA de *met2* se terminaba en las regiones metiladas del gen endógeno, produciéndose de este modo RNAs truncados aberrantes. Se sugirió que la metilación era una consecuencia de la interacción ectópica entre el transgén y una región homóloga de una región correspondiente del gen endógeno (Barry et al., 1993). La presencia de múltiples transgenes crearía una probabilidad aumentada de apareamiento ectópico y, por lo tanto, es consistente con la correlación entre un número de copias elevado y una resistencia vírica extrema (Mueller et al., 1995; Goodwin et al., 1996; Pang et al., 1996).

Esta área completa ha sido recientemente revisada [por ejemplo, Baulcombe (1996) y Stam et al. (1997)] y se han presentado diversos modelos. Todos los modelos exigen un elevado grado de especificidad de secuencias porque la resistencia es muy específica (de cepa) y, por lo tanto, recurren a una interacción por apareamiento de bases con un RNA producido a partir del transgén. Una explicación para la inducción de la resistencia vírica o el silenciamiento génico con transgenes sentido es que la RNA polimerasa dependiente de RNA de la planta genera RNAs complementarios al usar el mRNA del transgén como molde (Schiebel et al., 1993 a, b). Este hipotético RNA complementario (cRNA) no ha sido detectado (Baulcombe, 1996) pero se espera que los cRNAs sean RNAs pequeños y heterodispersos en lugar de complementos completos (Schiebel, 1993 a, b; Baulcombe, 1996) y, por lo tanto, difíciles de detectar.

Los posibles métodos de acción del cRNA en cuanto a la mediación en la resistencia vírica o el silenciamiento génico (como propone Baulcombe, 1996) son:

1. El cRNA se hibrida con mRNA transgénico o RNA vírico, y el dúplex llega a ser una diana para dsRNAsas;

2. El cRNA se hibrida con RNA diana para formar un dúplex que pueden detener la traducción y, en consecuencia, ejercer un efecto indirecto sobre la estabilidad (Green, 1993);

5 3. El dúplex formado entre el cRNA y el RNA vírico causa la detención, por el híbrido, de la traducción de cofactores necesarios para la replicación vírica; y

4. La hibridación del cRNA afecta al apareamiento intramolecular de bases necesario para la replicación vírica.

10 De este modo, los modelos actuales para resistencia vírica o silenciamiento génico implican la inducción de un sistema de vigilancia citoplásmico por niveles elevados de transcripción transgénica o por la producción de mRNA aberrante de cadena sencilla. Una vez que se pone el sistema en marcha, la RNA polimerasa dependiente de RNA genera cRNA a partir del mRNA transgénico. Estos cRNAs se hibridan con el RNA diana, afectando directamente a su traducibilidad o estabilidad o marcando el RNA para su degradación.

15 En los documentos US 5.190.131 y EP 0467349 A1 se describen métodos y medios para regular o inhibir la expresión génica en una célula al incorporar a, o asociar con, el material genético de la célula, una secuencia de ácido nucleico no nativa que es transcrita para producir un mRNA que es complementario de, y capaz de unirse a, el mRNA producido por el material genético de esa célula.

20 En el documento EP 0223399 A1 se describen métodos para efectuar cambios somáticos útiles en plantas al causar la transcripción, en las células vegetales, de cadenas de RNA negativas que son sustancialmente complementarias de una cadena de RNA diana. La cadena de RNA diana puede ser un transcrito de mRNA creado en la expresión génica, un RNA vírico u otro RNA presente en las células vegetales. La cadena de RNA negativa es complementaria de al menos una porción de la cadena de RNA diana para inhibir su actividad *in vivo*.

25 En el documento EP 0240208 se describe un método para regular la expresión de genes codificados en genomas de células vegetales, llevado a cabo por integración de un gen bajo el control transcripcional de un promotor que es funcional en el huésped y en que la cadena transcrita de DNA es complementaria de la cadena de DNA que es transcrita a partir de el(los) gen(es) endógeno(s) que se desea(n) regular.

30 En el documento EP 0647715 A1 y las patentes de Estados Unidos 5.034.323, 5.231.020 y 5.283.184 se describen métodos y medios para producir plantas que presentan unos rasgos fenotípicos deseados, al seleccionar "transgenes" (productos transgénicos intermedios) que comprenden un segmento de DNA operativamente enlazado a un promotor, en que los productos de transcripción del segmento son sustancialmente homólogos a los correspondientes transcritos de genes endógenos, particularmente genes endógenos de la ruta biosintética de los flavonoides.

35 En el documento WO 93/23551 se describen métodos y medios para la inhibición de dos o más genes diana, que comprenden introducir en la planta un único gen de control que tiene regiones definidas de DNA homólogas a cada uno de los genes diana, y un promotor operativo en plantas adaptado para transcribir de dichas regiones definidas un RNA que inhibe la expresión de cada uno de los genes diana.

40 En el documento WO 92/13070 se describe un método para la regulación de la traducción de ácido nucleico, que presenta una molécula de RNA sensible que codifica un polipéptido e incluye además un dominio regulador, una región sustrato y una secuencia de reconocimiento de ribosomas. Esta molécula de RNA sensible tiene una región inhibidor en el dominio regulador, dominio regulador que es complementario tanto de una región sustrato de la molécula de RNA sensible como de una región anti-inhibidor de un ácido nucleico señal para que, en ausencia del ácido nucleico señal, las regiones inhibidor y sustrato formen un dominio apareado por bases cuya formación reduzca el nivel de traducción de una de las regiones codificadoras de proteínas de la molécula de RNA sensible en comparación con el nivel de traducción de esa única región codificadora de proteína observada en presencia del ácido nucleico señal.

45 En el documento WO 92/13070 se describe un método para la regulación de la traducción de ácido nucleico, que presenta una molécula de RNA sensible que codifica un polipéptido e incluye además un dominio regulador, una región sustrato y una secuencia de reconocimiento de ribosomas. Esta molécula de RNA sensible tiene una región inhibidor en el dominio regulador, dominio regulador que es complementario tanto de una región sustrato de la molécula de RNA sensible como de una región anti-inhibidor de un ácido nucleico señal para que, en ausencia del ácido nucleico señal, las regiones inhibidor y sustrato formen un dominio apareado por bases cuya formación reduzca el nivel de traducción de una de las regiones codificadoras de proteínas de la molécula de RNA sensible en comparación con el nivel de traducción de esa única región codificadora de proteína observada en presencia del ácido nucleico señal.

50 Metzloff et al., 1997, describen un modelo para la degradación de RNA mediada por RNA y el silenciamiento de la chalcona sintasa A en *Petunia*, que implica ciclos de apareamiento de RNA-RNA entre secuencias complementarias seguidos de escisiones endonucleolíticas de RNA para describir cómo es posible que se promueva la degradación de RNA.

55 Fire et al., 1998, describen una interferencia genética específica por introducción experimental de RNA de doble cadena en *Caenorhabditis elegans*. Se discute la importancia de estos hallazgos para la genómica funcional (Wagner y Sun, 1998).

60 Que et al., 1998, describen patrones definidos de supresión pigmentaria que se producen mediante transgenes alélicos sentido y antisentido de la chalcona sintasa en flores de petunia y han analizado además patrones de colores de flores en plantas heterocigotas para alelos sentido y antisentido de la chalcona sintasa.

65 En el documento WO 98/05770 se describe un RNA antisentido con estructuras secundarias especiales que puede ser utilizado para inhibir la expresión génica.

En el documento WO 94/18337 se describen plantas transformadas que tienen niveles aumentados o disminuidos de ácidos linolénicos, así como plantas que expresan un ácido linoleico desaturasa.

5 En el documento US 5.850.026 se describe un aceite endógeno de semillas de *Brassica* que contiene, después de la trituración y la extracción, más de 86% de ácido oleico y menos de 2,5% de ácido  $\alpha$ -linolénico. El aceite también contiene menos de 7% de ácido linoleico. Las semillas de *Brassica* son producidas por plantas que contienen una inhibición, específica de la semilla, de la expresión génica de la oleato desaturasa microsomal y la linoleato desaturasa microsomal, en que la inhibición puede ser creada por cosupresión o tecnología antisentido.

10 En el documento US 5.638.637 se describen un aceite vegetal de semillas de colza y una semilla de colza que produce el mismo, aceite vegetal que tiene un contenido infrecuentemente elevado de ácido oleico, del 80% al 90% en peso con respecto al contenido total de ácidos grasos.

## 15 **SUMARIO DEL INVENTO**

El presente invento proporciona métodos para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, que se puede expresar en una célula eucariótica, particularmente para reducir la expresión fenotípica de un gen, particularmente un gen endógeno o un transgén extraño, integrado en el genoma de una célula eucariótica, o para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés que está comprendido en el genoma de un virus infectivo, que comprende la operación de introducir en dicha célula, preferiblemente integrar en el genoma nuclear de la célula eucariótica, un DNA quimérico que comprende un promotor, capaz de expresarse en esa célula eucariótica, y opcionalmente una región de DNA implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación y una región de DNA intermedia, que, cuando se transcribe, produce una molécula de RNA con una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos sentido de al menos 10 nucleótidos consecutivos, particularmente de al menos aproximadamente 550 nucleótidos consecutivos, que tiene una identidad de secuencia de entre 75 y 100% con al menos parte de una región de codificación del ácido nucleico de interés, y una secuencia de nucleótidos antisentido que incluye al menos 10 nucleótidos consecutivos, que tiene una identidad de secuencia de entre aproximadamente 75% y aproximadamente 100% con el tramo de 10 nucleótidos del complemento de la secuencia de nucleótidos sentido, en que el RNA es capaz de formar una estructura de RNA artificial en horquilla con un tallo de RNA de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con secuencias de nucleótidos sentido y antisentido de modo que al menos los 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido se apareen por bases con los 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido, para dar lugar a una estructura artificial en horquilla, en que dicho ácido nucleico de interés es un gen integrado en el genoma de dicha célula eucariótica, y en que dicho método no es un método de tratamiento del organismo humano o animal por cirugía o terapia, ni un método diagnóstico llevado a la práctica en el organismo humano o animal. Preferiblemente, el DNA quimérico se integra establemente en el genoma del DNA.

El invento también proporciona un método para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, que se puede expresar en una célula eucariótica, que comprende la operación de introducir en dicha célula una molécula de RNA quimérica que comprende al menos una región de RNA con una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos sentido de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de entre 75 y 100% con al menos parte de una región de codificación del ácido nucleico de interés; y una secuencia de nucleótidos antisentido que incluye al menos 10 nucleótidos consecutivos, que tiene una identidad de secuencia de entre aproximadamente 75% y aproximadamente 100% con el complemento de dichos al menos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos sentido; en que la región de RNA es capaz de formar una estructura de RNA artificial en horquilla con un tallo de RNA de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con secuencias de nucleótidos sentido y antisentido de modo que al menos los 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido se apareen por bases con los 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido, en que dicho ácido nucleico de interés es un gen integrado en el genoma de dicha célula eucariótica, y en que dicho método no es un método de tratamiento del organismo humano o animal por cirugía o terapia, ni un método diagnóstico llevado a la práctica en el organismo humano o animal.

El invento también proporciona un método para identificar un fenotipo asociado con la expresión de un ácido nucleico de interés en una célula eucariótica, siendo dicho ácido nucleico de interés un gen integrado en el genoma de dicha célula eucariótica, método que comprende las operaciones de seleccionar una secuencia diana de al menos 10 nucleótidos consecutivos dentro de la secuencia de nucleótidos de interés; diseñar una secuencia de nucleótidos sentido que corresponda a la longitud de la secuencia diana seleccionada y que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 75% a aproximadamente 100% con la secuencia diana seleccionada, y diseñar una secuencia de nucleótidos antisentido que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 75% a aproximadamente 100% con el complemento de la secuencia de nucleótidos sentido y comprenda un tramo de al menos aproximadamente 10 nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia del 100% con respecto al complemento de una parte de la secuencia de nucleótidos sentido. El método comprende además las operaciones de introducir una molécula de RNA que comprende ambas secuencias de nucleótidos diseñadas, la sentido y la antisentido, en una célula huésped eucariótica adecuada que comprende el ácido nucleico que incluye la secuencia de nucleótidos con el fenotipo hasta ahora no identificado, en que dicho RNA es capaz de formar una estructura de RNA artificial en horquilla con un tallo de RNA de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con

las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido de modo que al menos dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido se apareen por bases con dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido; y observar el fenotipo mediante un método adecuado.

5 El invento también proporciona una célula eucariótica que comprende un ácido nucleico de interés que se puede expresar fenotípicamente, que comprende además una molécula de DNA quimérica que comprende un promotor, capaz de expresarse en esa célula eucariótica, una región de DNA que, cuando se transcribe, produce una molécula de RNA con al menos una región de RNA con una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos sentido de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de entre 75 y 100% con al menos parte de una región de codificación del ácido nucleico de interés y una secuencia de nucleótidos antisentido que incluye al menos 10 nucleótidos consecutivos, que tiene una identidad de secuencia de entre aproximadamente 75% y aproximadamente 100% con el complemento de los al menos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos sentido, en que la molécula de RNA es capaz de formar una estructura de RNA artificial en horquilla con un tallo de RNA de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido de modo que al menos dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido se apareen por bases con dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido, siendo dicho ácido nucleico de interés un gen integrado en el genoma de dicha célula eucariótica, y preferiblemente una región de DNA implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación, en que la expresión fenotípica del ácido nucleico de interés está significativamente reducida.

20 El invento también proporciona una célula eucariótica que comprende un ácido nucleico de interés, que se puede expresar fenotípicamente, que comprende además una molécula de RNA quimérica que comprende al menos una región de RNA con una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos sentido de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de entre 75 y 100% con al menos parte de una región de codificación del ácido nucleico de interés y una secuencia de nucleótidos antisentido que incluye al menos 10 nucleótidos consecutivos, que tiene una identidad de secuencia de entre aproximadamente 75% y aproximadamente 100% con el complemento de los al menos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos sentido, en que el RNA es capaz de formar un RNA artificial en horquilla con una región de cadena doble por apareamiento de bases entre las regiones con las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido de modo que al menos dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido se aparean por bases con dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido, para dar lugar a una estructura artificial de RNA en horquilla, y en que dicho ácido nucleico de interés es un gen integrado en el genoma de dicha célula eucariótica.

35 El invento también proporciona un método para modificar el perfil de ácidos grasos de un aceite, preferiblemente incrementar el contenido de ácido oleico, de una planta, preferiblemente de colza de semilla oleaginosa, método que comprende la operación de introducir en las células de la planta un DNA quimérico que comprende las siguientes partes operativamente enlazadas: a) un promotor expresable en la planta, preferiblemente un promotor específico de la semilla; b) una región de DNA, particularmente con la secuencia de nucleótidos de ID. SEC. nº 6, que, cuando se transcribe, produce una molécula de RNA que comprende una región de RNA capaz de formar una estructura artificial de tallo-bucle, en que una de las secuencias de RNA hibridantes de la estructura de tallo-bucle comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de al menos 75% con al menos parte de la secuencia de nucleótidos de un marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta 12$  desaturasa, y en que la segunda de las secuencias de RNA hibridantes comprende una secuencia de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de al menos 75% con al menos parte del complemento de al menos parte de la secuencia de nucleótidos de dicho marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta 12$  desaturasa; y, opcionalmente, c) una región de DNA implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación. Mediante el invento también se proporcionan plantas con un perfil de ácidos grasos modificado, particularmente con un contenido aumentado de ácido oleico, que comprenden los mencionados genes quiméricos. También se abarcan los aceites obtenidos a partir de dichas plantas o semillas.

50 Con lo precedente y otros objetos, ventajas y características del invento que se harán evidentes más adelante, la naturaleza del invento puede ser entendida más claramente por referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas del invento y a las reivindicaciones adjuntas.

## 55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** representa esquemáticamente las diferentes construcciones sentido y antisentido, así como las llamadas construcciones CoP (par complementario; del inglés, Complementary Pair) usadas para obtener resistencia a virus (Figura 1B) o para reducir la expresión fenotípica de un gen GUS transgénico (Figura 1A).

60 La **Figura 2A** representa esquemáticamente la llamada construcción en "mango de sartén" o construcciones CoP usadas para reducir la expresión fenotípica de un gen de la  $\Delta 12$  desaturasa en *Arabidopsis* (Nos Pro: promotor del gen de la nopalina sintasa; nptII: región de codificación de la neomicina fosfotransferasa; Nos term: terminador del gen de la nopalina sintasa; FP1: promotor truncado de la napina, específico de semillas; 480 bp: extremo 5' del gen Fad2 de *Arabidopsis thaliana* en orientación sentido; 623 bp: espaciador; 480 bp: extremo 5' del gen Fad2 de *Arabidopsis thaliana* en orientación antisentido).

La **Figura 2 B** representa esquemáticamente una construcción de cosupresión común para reducir la expresión fenotípica de un gen de  $\Delta 12$  desaturasa en *Arabidopsis thaliana*.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS DEL INVENTO

5 Uno de los objetivos del invento es proporcionar una célula eucariótica, particularmente una célula vegetal, con una molécula de RNA que comprende una estructura en horquilla que incluye una determinada parte sentido y una determinada parte antisentido. Potencialmente, una molécula de RNA es capaz de formar diversas estructuras secundarias, algunas de las cuales pueden contener la deseada horquilla. Se espera que la estructura secundaria real del  
10 RNA en la célula tenga la energía libre más baja. De acuerdo con el invento, la molécula de RNA que se va a producir en la célula es diseñada de tal modo que, al menos en su estado de energía libre más bajo que puede tomar en esa célula, comprenda la deseada horquilla.

15 Como aquí se utiliza, "RNA en horquilla" se refiere a cualquier molécula de RNA de doble cadena autohíbrida. En su representación más sencilla, un RNA en horquilla consiste en un tallo de doble cadena generado por las cadenas de RNA híbridantes, conectado por un bucle de RNA de cadena sencilla, y a él también se hace referencia como un "RNA de mango de sartén". Sin embargo, con la expresión "RNA en horquilla" también se quiere abarcar estructuras de RNA secundarias más complicadas que comprenden secuencias de RNA de doble cadena autohíbridas pero también protuberancias y bucles internos. La estructura secundaria específica adaptada vendrá determinada por la  
20 energía libre de la molécula de RNA y podrá ser predicha para diferentes situaciones utilizando un software apropiado tal como FOLDRNA (Zuker y Stiegler, 1981).

25 Como aquí se utiliza, "identidad de secuencia" con respecto a secuencias de nucleótidos (DNA o RNA) se refiere al número de posiciones con nucleótidos idénticos dividido por el número de nucleótidos en la más corta de las dos secuencias. El alineamiento de las dos secuencias de nucleótidos se lleva a cabo mediante el algoritmo de Wilbur y Lipmann (Wilbur y Lipmann, 1983) utilizando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos y una penalización por hueco de 4. El análisis y la interpretación de los datos de secuencias asistidos por ordenador, incluyendo el alineamiento de secuencias del modo anteriormente descrito, se pueden llevar convenientemente a cabo, por ejemplo, utilizando los programas de la Intelligenetics™ Suite (Intelligenetics Inc., California, EE.UU.). Se indica que las secuencias son "esencialmente similares" cuando tienen una identidad secuencial de al  
30 menos aproximadamente 75%, particularmente de al menos aproximadamente 80%, más particularmente de al menos aproximadamente 85%, muy particularmente de aproximadamente 90%, especialmente de aproximadamente 95%, más especialmente de aproximadamente 100%, y muy especialmente cuando son idénticas. Es evidente que cuando se dice que las secuencias de RNA son esencialmente similares o tienen un cierto grado de identidad secuencial con secuencias de DNA, la timina (T) de la secuencia de DNA es considerada igual al uracilo (U) de la secuencia de RNA.

35 Como aquí se utiliza, la expresión "promotor expresable en plantas" significa una secuencia de DNA que es capaz de controlar (iniciar) la transcripción en una célula vegetal. Esto incluye cualquier promotor de origen vegetal pero también cualquier promotor de origen no vegetal que sea capaz de dirigir la transcripción en una célula vegetal, es decir, ciertos promotores de origen vírico o bacteriano tales como el CaMV 35S, el promotor nº 4 o nº 7 del virus del trébol subterráneo y promotores de genes de T-DNA.

40 La frase "expresión de un gen" se refiere al proceso en el que una región de DNA que está operativamente enlazada con regiones reguladoras apropiadas, particularmente con un promotor, se transcribe en un RNA que es biológicamente activo, es decir, que es capaz de interacción con otro ácido nucleico o que es capaz de traducirse en un polipéptido o una proteína. Se dice que un gen codifica un RNA cuando el producto final de la expresión del gen es RNA biológicamente activo, tal como, por ejemplo, un RNA antisentido, una ribozima o un producto intermedio replicativo. Se dice que un gen codifica una proteína cuando el producto final de la expresión del gen es una proteína o un polipéptido.  
45

50 Un ácido nucleico de interés es "capaz de expresarse" cuando dicho ácido nucleico, cuando está introducido en una célula huésped adecuada, particularmente en la célula vegetal, se puede transcribir (o replicar) para producir un RNA, y/o traducir para producir un polipéptido o una proteína en esa célula huésped.  
55

60 El término "gen" significa cualquier fragmento de DNA que comprende una región de DNA (la "región de DNA transcrita") que se transcribe en una molécula de RNA (por ejemplo un mRNA) en una célula, operativamente enlazada con regiones reguladoras adecuadas, tales como, por ejemplo, un promotor expresable en plantas. De este modo, un gen puede comprender diversos fragmentos de DNA operativamente enlazados, tales como un promotor, una secuencia líder 5', una región de codificación y una región 3' que comprende un sitio de poliadenilación. Un gen vegetal endógeno con respecto a una especie vegetal particular (gen vegetal endógeno) es un gen que se encuentra naturalmente en esa especie vegetal o que se puede introducir en esa especie vegetal por cultivo convencional. Un gen quimérico es cualquier gen que no se encuentra normalmente en una especie vegetal o, alternativamente, cualquier gen en que el promotor no está asociado en la naturaleza con parte de, o toda, la región de DNA transcrita ni  
65 con al menos otra región reguladora del gen.

Como aquí se utiliza, "expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés" se refiere a cualquier rasgo cuantitativo asociado con la expresión molecular de un ácido nucleico en una célula huésped y, de este modo, puede incluir la cantidad de moléculas de RNA transcritas o replicadas, la cantidad de moléculas de RNA postranscripcionalmente modificadas, la cantidad de péptidos o proteínas traducidos, y la actividad de dichos péptidos o proteínas.

5 Un "rasgo fenotípico" asociado con la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés se refiere a cualquier rasgo cuantitativo o cualitativo, incluyendo el rasgo mencionado, así como el efecto directo o indirecto mediado sobre la célula, o el organismo que contiene esa célula, por la presencia de las moléculas de RNA, el péptido o proteína, o el péptido o proteína postraduccionalmente modificado. La mera presencia de un ácido nucleico en una célula huésped no es considerada una expresión fenotípica ni un rasgo fenotípico de ese ácido nucleico, aun cuando pueda ser cuantitativa o cualitativamente rastreado. Los ejemplos de efectos directos o indirectos mediados sobre células u organismos son, por ejemplo, rasgos agronómicos o industrialmente útiles, tales como la resistencia a una plaga o enfermedad, un contenido mayor o modificado de aceites, etc.

15 Como aquí se utiliza, "reducción de la expresión fenotípica" se refiere a la comparación de la expresión fenotípica del ácido nucleico de interés en la célula eucariótica en presencia del RNA o los genes quiméricos del invento, con la expresión fenotípica del ácido nucleico de interés en ausencia del RNA o los genes quiméricos del invento. La expresión fenotípica en presencia del RNA quimérico del invento debería ser así menor que la expresión fenotípica en ausencia del mismo, preferiblemente sólo aproximadamente el 25%, particularmente sólo aproximadamente el 10%, más particularmente sólo aproximadamente el 5%, de la expresión fenotípica en ausencia del RNA quimérico; especialmente, para todos los fines prácticos, la expresión fenotípica debería resultar completamente inhibida por la presencia del RNA quimérico o el gen quimérico que codifica dicho RNA.

25 Una reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico cuando el fenotipo es un rasgo cualitativo significa que, en presencia del gen o RNA quimérico del invento, el rasgo fenotípico se desplaza a un estado discreto diferente cuando se compara con una situación en que dicho RNA o gen está ausente. De este modo, una reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico puede ser medida, entre otras formas, como una reducción de la transcripción de (parte de) ese ácido nucleico, una reducción de la traducción de (parte de) ese ácido nucleico o una reducción del efecto que la presencia de el(los) RNA(s) transcrito(s) o el(los) polipéptido(s) traducido(s) ejerce(n) sobre la célula eucariótica o el organismo, y conducirá finalmente a rasgos fenotípicos alterados. Es evidente que la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés puede ir acompañada de, o estar correlacionada con, un aumento de un rasgo fenotípico.

35 Como aquí se utiliza, un "ácido nucleico de interés" o un "ácido nucleico diana" se refiere a cualquier secuencia de DNA o molécula de RNA particular que puede estar presente en una célula eucariótica, particularmente en una célula vegetal.

40 Como aquí se usa, "que comprende" ha de ser interpretado como especificación de la presencia de las características, números enteros, operaciones o componentes indicados como a ellos se hace referencia, pero no excluye la presencia ni adición de una o más características, números enteros, operaciones o componentes, o grupos de los mismos. De esta manera, por ejemplo, un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los realmente citados, es decir, embebidos en un ácido nucleico o proteína más grande. Un gen quimérico que comprende una región de DNA que está funcional o estructuralmente definida puede comprender regiones de DNA adicionales, etc.

45 Los inventores han hallado inesperadamente que la introducción de un gen quimérico capaz de transcribirse en una molécula de RNA con una secuencia de nucleótidos que comprende las secuencias de nucleótidos tanto sentido como antisentido de un gen diana, o parte de las mismas, integrado en el genoma nuclear de una célula vegetal, podría reducir eficaz y específicamente la expresión fenotípica de ese gen diana. La reducción de la expresión fenotípica fue más eficaz y más previsible que la observada cuando se introdujeron genes quiméricos separados, que codificaban moléculas de RNA sentido o antisentido, en células similares con el gen diana.

50 En una realización del invento, se proporciona un método para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, que normalmente es capaz de expresarse en una célula eucariótica, particularmente una célula vegetal, que comprende las operaciones de introducir un DNA quimérico que comprende las siguientes partes operativamente enlazadas:

a) un promotor, operativo en esa célula, particularmente un promotor expresable en plantas;

60 b) una región de DNA capaz de transcribirse en una molécula de RNA con una secuencia de nucleótidos que comprende

i. una secuencia de nucleótidos sentido de al menos 10, preferiblemente 15, nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de entre 75 y 100% con al menos parte de una región de codificación de dicho ácido nucleico de interés; y

65

- ii. una secuencia de nucleótidos antisentido que incluye al menos 10, preferiblemente 15, nucleótidos consecutivos, que tiene una identidad de secuencia de entre aproximadamente 75% y aproximadamente 100% con el complemento de los al menos 10, preferiblemente 15, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos sentido;

5 en que el RNA es capaz de formar una estructura de RNA artificial en horquilla con un tallo de RNA de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con secuencias de nucleótidos sentido y antisentido de modo que al menos dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido se apareen por bases con dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido; en que dicho ácido nucleico de interés es un gen integrado en el genoma  
10 de dicha célula eucariótica, y en que dicho método no es un método de tratamiento del organismo humano o animal por cirugía o terapia, ni un método diagnóstico llevado a la práctica en el organismo humano o animal; y, opcionalmente,

- 15 c) una región de DNA implicada en el funcionamiento de la terminación de la transcripción y la poliadenilación en las células eucarióticas adecuadas, particularmente el funcionamiento en células vegetales.

En una realización preferida del invento, la molécula de RNA transcrita a partir del gen quimérico consiste esencialmente en el RNA en horquilla.

20 Se cree que el orden de las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido en la molécula de RNA no es crítico.

De este modo, en otras palabras, el DNA quimérico tiene una región de DNA transcrita que, cuando se transcribe, produce una molécula de RNA que comprende una región de RNA capaz de formar una estructura artificial de tallo-bucle, en que una de las secuencias de RNA hibridantes de la estructura de tallo-bucle comprende una secuencia de  
25 al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de al menos 75% con al menos parte de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de interés, y en que la segunda de las secuencias de RNA hibridantes comprende una secuencia de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de al menos 75% con al menos parte del complemento de al menos parte de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de interés.

30 La molécula de RNA puede comprender varias estructuras artificiales en horquilla, que pueden ser diseñadas para reducir la expresión fenotípica de diferentes ácidos nucleicos de interés.

35 El ácido nucleico de interés al que se dirige la reducción de su expresión fenotípica es un gen incorporado en el genoma de una célula eucariótica, particularmente una célula vegetal. Se apreciará que los medios y métodos del invento pueden ser usados para la reducción de la expresión fenotípica de un gen que pertenece al genoma de la célula como se encuentra en la naturaleza (un gen endógeno), así como para la reducción de la expresión fenotípica de un gen que no pertenece al genoma de la célula como se encuentra en la naturaleza pero ha sido introducido en esa célula (un transgén). El transgén se puede introducir establemente y se integra en el genoma nuclear de la célula.  
40

45 En otra realización preferida, el ácido nucleico de interés al que se dirige la reducción de su expresión fenotípica es un ácido nucleico viral, particularmente una molécula de RNA viral, capaz de infectar una célula eucariótica, particularmente una célula vegetal. En este caso, el fenotipo que se va a reducir es la replicación del virus y, finalmente, los síntomas morbosos causados por el virus infectivo.

50 La secuencia de nucleótidos del ácido nucleico diana que corresponde a la secuencia de nucleótidos sentido es parte de una región de DNA que es transcrita, particularmente una región de DNA que es transcrita y traducida (en otras palabras, una región de codificación). Se prefiere particularmente que la secuencia diana corresponda a uno o más exones consecutivos, y, más particularmente, que esté situada dentro de un solo exón de una región de codificación.

55 La longitud de la secuencia de nucleótidos sentido puede variar desde aproximadamente 10 nucleótidos (nt) hasta una longitud igual a la longitud (en nucleótidos) del ácido nucleico diana. Preferiblemente, la longitud total de la secuencia de nucleótidos sentido es al menos 10 nt, preferiblemente 15 nt, particularmente al menos aproximadamente 50 nt, más particularmente al menos aproximadamente 100 nt, especialmente al menos aproximadamente 150 nt, más especialmente al menos aproximadamente 200 nt, muy especialmente al menos aproximadamente 550 nt. Se espera que no haya más límite superior para la longitud total de la secuencia de nucleótidos sentido que la longitud total del ácido nucleico diana. Sin embargo, por razones prácticas (tal como, por ejemplo, la estabilidad de los genes quiméricos), se espera que la longitud de la secuencia de nucleótidos sentido no exceda de 5000 nt, particularmente  
60 no exceda de 2500 nt, y podría limitarse a aproximadamente 1000 nt.

65 Se apreciará que cuanto mayor sea la longitud total de la secuencia de nucleótidos sentido, menos rigurosos serán los requisitos para la identidad de secuencias entre la secuencia de nucleótidos sentido total y la correspondiente secuencia del gen diana. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos sentido total debería tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 75% con la correspondiente secuencia diana, particularmente al menos

aproximadamente 80%, más particularmente al menos aproximadamente 85%, muy particularmente aproximadamente 90%, especialmente aproximadamente 95%, y más especialmente aproximadamente 100%; muy especialmente, debería ser idéntica a la parte correspondiente del ácido nucleico diana. Sin embargo, se prefiere que la secuencia de nucleótidos sentido incluya siempre una secuencia de aproximadamente 10 nucleótidos consecutivos, particularmente aproximadamente 20 nt, más particularmente aproximadamente 50 nt, especialmente aproximadamente 100 nt, muy especialmente aproximadamente 150 nt, con una identidad de secuencia del 100% con respecto a la parte correspondiente del ácido nucleico diana. Preferiblemente, para calcular la identidad de secuencias y diseñar la correspondiente secuencia sentido, debería minimizarse el número de huecos, particularmente para las secuencias sentido más cortas.

La longitud de la secuencia de nucleótidos antisentido viene determinada en gran medida por la longitud de la secuencia de nucleótidos sentido, y corresponderá preferiblemente a la longitud de esta última secuencia. Sin embargo, es posible utilizar una secuencia antisentido cuya longitud difiera en aproximadamente 10%. Similarmente, la secuencia de nucleótidos de la región antisentido viene determinada en gran medida por la secuencia de nucleótidos de la región sentido y, preferiblemente, es idéntica al complemento de la secuencia de nucleótidos de la región sentido. Sin embargo, particularmente con regiones antisentido más largas, es posible utilizar secuencias antisentido con una identidad de secuencia menor con respecto al complemento de la secuencia de nucleótidos sentido, preferiblemente con una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 80%, particularmente de al menos aproximadamente 85%, más particularmente de al menos aproximadamente 90%, especialmente de al menos aproximadamente 95%, con respecto al complemento de la secuencia de nucleótidos sentido. No obstante, se prefiere que la secuencia de nucleótidos antisentido siempre incluya una secuencia de aproximadamente 10, preferiblemente 15, nucleótidos consecutivos, particularmente aproximadamente 20 nt, más particularmente aproximadamente 50 nt, especialmente aproximadamente 100 nt, muy especialmente aproximadamente 150 nt, con una identidad de secuencia del 100% con respecto al complemento de una parte correspondiente de la secuencia de nucleótidos sentido. Es evidente que la longitud del tramo de los nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia del 100% con respecto al complemento de la secuencia de nucleótidos sentido no puede ser mayor que la de la propia secuencia de nucleótidos sentido. De nuevo, el número de huecos debería ser preferiblemente minimizado, particularmente para las secuencias antisentido más cortas. Además, también se prefiere que la secuencia antisentido tenga una identidad de secuencia de entre aproximadamente 75% y 100% con el complemento de la secuencia diana.

La molécula de RNA que resulta de la transcripción del DNA quimérico puede comprender una secuencia de nucleótidos espaciadora situada entre las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido. En ausencia de dicha secuencia espaciadora, la molécula de RNA aún será capaz de formar un RNA de doble cadena, particularmente si las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido son mayores de aproximadamente 10 nucleótidos, y se usará parte de las secuencias de nucleótidos sentido y/o antisentido para formar el bucle que permite el apareamiento de bases entre las regiones con secuencias de nucleótidos sentido y antisentido y la formación de un RNA de doble cadena. Se cuenta con que no haya límites de longitud ni requisitos secuenciales asociados con la región espaciadora con tal de que estos parámetros no interfieran en la capacidad de las regiones de RNA con las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido para formar un RNA de cadena doble. En una realización preferida, la longitud de la región espaciadora varía de 4 a aproximadamente 200 pares de bases (bp; del inglés, base pairs) pero, como se mencionó previamente, la región espaciadora puede estar ausente.

En una realización preferida, el RNA en horquilla formado por las regiones sentido y antisentido y, si fuera apropiado, la región espaciadora es un RNA artificial en horquilla. Por "RNA artificial en horquilla" o "estructura de RNA artificial de tallo-bucle" se quiere significar que dicho RNA en horquilla no se encuentra en la naturaleza porque las regiones sentido y antisentido que se definen no se encuentran simultáneamente en la naturaleza en una molécula de RNA, o porque las regiones sentido y antisentido están separadas por una región espaciadora que es heteróloga con respecto al gen diana, particularmente, la secuencia de nucleótidos del espaciador tiene una identidad de secuencia inferior al 75% con la secuencia de nucleótidos de la secuencia diana, en la correspondiente posición 5' o 3' de los puntos finales de la secuencia de nucleótidos sentido. También se puede indicar un RNA en horquilla como artificial si no está comprendido dentro de la molécula de RNA con la que se asocia normalmente. Es concebible utilizar, de acuerdo con el invento, un DNA quimérico cuya transcripción dé lugar a una estructura de RNA en horquilla con una secuencia de nucleótidos presente en la naturaleza (que, por lo demás, satisface los límites que se exponen en esta memoria descriptiva) con tal de que este RNA en horquilla esté desprovisto de las secuencias de RNA circundantes (no implicadas en la formación de la estructura en horquilla).

Aunque se prefiere que la molécula de RNA que comprende el RNA en horquilla no comprenda además una secuencia intrónica, es evidente que los genes de DNA quiméricos que codifican dichos RNAs pueden comprender uno o más intrones en su región transcrita.

En realidad, los inventores han hallado inesperadamente que la inclusión de una secuencia intrónica en los genes de DNA quiméricos que codifican una molécula de RNA que comprende el RNA en horquilla, preferiblemente en la región espaciadora y preferiblemente en orientación sentido, potencia la eficacia de la reducción de la expresión del ácido nucleico diana. La potenciación de la eficacia se puede expresar como un aumento en la frecuencia de las plantas en que se produce silenciamiento o como un aumento en el nivel de reducción del rasgo fenotípico. En una

realización particularmente preferida, el intrón tiene una secuencia esencialmente idéntica a la del intrón 2 de la piruvato ortofosfato dicinasa 2 de *Flaveria trinervia*; más particularmente, comprende la secuencia de ID. SEC. nº 7.

5 Se ha observado que, contrariamente a los métodos en que se utilizan secuencias de nucleótidos antisentido o sentido  
solas para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico diana (que dependen generalmente de la dosifi-  
cación de la molécula sentido o antisentido y, en consecuencia, es necesario que los genes quiméricos que codifican  
las moléculas sentido y antisentido estén bajo el control de promotores relativamente potentes), el método del inven-  
to actual no depende de la presencia de dichas regiones promotoras potentes para conducir la producción transcrip-  
cional del RNA que comprende tanto la región sentido como la antisentido. En otras palabras, se dispone de una  
10 variedad completa de promotores, particularmente promotores expresables en plantas, para dirigir la transcripción de  
los genes quiméricos del invento. Aquellos incluyen, pero no se limitan a, promotores potentes tales como los pro-  
motores CaMV 35S (por ejemplo, Harpster et al., 1988). A la luz de la existencia de formas variantes del promotor  
CaMV 35S, como sabe el técnico experto, el objeto del invento puede ser alcanzado igualmente empleando estos  
promotores y variantes CaMV 35S alternativos. Es también evidente que, para obtener efectos similares, se pueden  
15 utilizar otros promotores expresables en plantas, particularmente promotores constitutivos, tales como los promoto-  
res de la opina sintasa de los plásmidos Ti o Ri de *Agrobacterium*, particularmente un promotor de la nopalina sintasa,  
o promotores del virus del trébol subterráneo. El invento también contempla genes quiméricos para reducir la  
expresión fenotípica de un ácido nucleico en una célula, que están bajo el control de promotores específicos de RNA  
polimerasa de bacteriófago de una sola subunidad, tal como un promotor específico de T7 o T3, con tal de que las  
20 células huésped también comprendan la correspondiente RNA polimerasa en una forma activa.

Un objeto más del invento es proporcionar métodos para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico en  
células específicas, particularmente células vegetales específicas, al poner los genes quiméricos del invento bajo el  
control de promotores específicos de tejidos o específicos de órganos. Dichos promotores específicos de tejidos o  
25 específicos de órganos son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, promotores específicos de  
semillas (por ejemplo, WO 89/03887), promotores específicos de primordios de órganos (An et al., 1996), promoto-  
res específicos de tallos (Keller et al., 1988), promotores específicos de hojas (Hudspeth et al., 1989), promotores  
específicos de mesófilos (tales como los promotores de Rubisco inducibles por luz), promotores específicos de raíces  
(Keller et al., 1989), promotores específicos de tubérculos (Keil et al., 1989), promotores específicos del tejido  
30 vascular (Peleman et al., 1989), promotores selectivos de estambres (WO 89/10396, WO 92/13956), promotores  
específicos de zonas de dehiscencia (WO 97/13865) y similares.

En otra realización del invento, la expresión de un gen quimérico para reducir la expresión fenotípica de un ácido  
nucleico diana puede ser controlada a voluntad mediante la aplicación de un inductor químico apropiado, enlazando  
operativamente la región de DNA transcrita de los genes quiméricos del invento a un promotor cuya expresión es  
35 inducida por un compuesto químico, tal como el promotor del gen descrito en la publicación de Patente Europea  
("EP") 0332104 o el promotor del gen descrito en el documento WO 90/08826.

Las moléculas de RNA, que comprenden las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido capaces de formar una  
estructura en horquilla, que se producen por la transcripción de los genes quiméricos, pueden ser también directa-  
mente introducidas en una célula vegetal para reducir la expresión fenotípica del ácido nucleico diana, particular-  
mente para reducir la expresión fenotípica de un gen endógeno específico, o un transgén específico.

Dichas moléculas de RNA podrían ser producidas, por ejemplo:

- 45 1. clonando la región de DNA capaz de transcribirse en una molécula de RNA con una secuencia de nucleótidos  
que comprende una secuencia de nucleótidos sentido de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una  
identidad de secuencia de entre 75 y 100% con al menos parte de una región de codificación del ácido nucleico  
de interés, y una secuencia de nucleótidos antisentido que incluye al menos 10 nucleótidos consecutivos  
50 que tiene una identidad de secuencia de entre aproximadamente 75% y aproximadamente 100% con el com-  
plemento de los al menos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos sentido, por lo que el  
RNA es capaz de formar un RNA de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con secuen-  
cias de nucleótidos sentido y antisentido para dar lugar a una estructura de RNA en horquilla, bajo el control  
de un adecuado promotor para el reconocimiento por una RNA polimerasa dependiente de DNA en una reac-  
55 ción de transcripción in vitro, tal como, pero sin limitarse a, un promotor específico de polimerasa de T7;
2. llevando a cabo una reacción de transcripción in vitro añadiendo, inter alia, la adecuada RNA polimerasa de-  
pendiente de DNA así como los reactivos necesarios para generar las moléculas de RNA; y
- 60 3. aislando las moléculas de RNA.

Los métodos de transcripción in vitro así como otros métodos para la producción de RNA in vitro son bien conocidos  
en la técnica, y se dispone de kits comerciales para ellos. Los métodos para la introducción directa de RNA en célu-  
las vegetales son también asequibles a la persona experta e incluyen, pero no se limitan a, electroporación, microin-  
yección y similares.

El(los) gen(es) quimérico(s) para la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico diana de interés en una célula se puede(n) introducir transitoriamente o se puede(n) integrar establemente en el genoma nuclear de la célula. En una realización, el gen quimérico está situado en un vector vírico que es capaz de replicarse en la célula eucariótica, particularmente la célula vegetal (véanse, por ejemplo, los documentos WO 95/34668 y WO 93/03161).

El DNA recombinante que comprende el gen quimérico para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés en una célula huésped puede ir acompañado de un gen marcador quimérico, particularmente cuando se prevé la integración estable del transgén en el genoma de la célula huésped. El gen marcador quimérico puede comprender un DNA marcador que esté operativamente enlazado por su extremo 5' a un promotor, que funciona en la célula huésped de interés, particularmente un promotor expresable en plantas, preferiblemente un promotor constitutivo, tal como el promotor CaMV 35S, o un promotor inducible por luz tal como el promotor del gen que codifica la subunidad pequeña de Rubisco; y operativamente enlazado por su extremo 3' a adecuadas señales de poliadenilación y formación de extremos 3' de transcripción de plantas. Se espera que la elección del DNA marcador no sea crítica, y se puede usar cualquier DNA marcador adecuado. Por ejemplo, un DNA marcador puede codificar una proteína que proporcione un color distinguible a la célula vegetal transformada, tal como el gen A1 (Meyer et al., 1987), puede proporcionar resistencia a herbicidas a la célula vegetal transformada, tal como el gen *bar*, que codifica resistencia a la fosfotricina (documento EP 0.242.246), o puede proporcionar resistencia a antibióticos a las células transformadas, tal como el gen *aac(6')*, que codifica resistencia a la gentamicina (documento WO 94/01560).

Un DNA recombinante que comprende un gen quimérico para reducir la expresión fenotípica de un gen de interés se puede incorporar establemente al genoma nuclear de una célula de una planta. La transferencia génica puede ser llevada a cabo con un vector que es un plásmido Ti desarmado, que comprende un gen quimérico del invento, y portado por *Agrobacterium*. Esta transformación puede ser llevada a cabo usando los procedimientos descritos en, por ejemplo, el documento EP 0116718.

Alternativamente, se puede usar cualquier tipo de vector para transformar la célula vegetal, aplicando métodos tales como transferencia génica directa (como se describe, por ejemplo, en el documento EP 0233247), transformación mediada por polen (como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0270356, WO 85/01856 y US 4.684.611), transformación mediada por virus de RNA de plantas (como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0067553 y US 4.407.956), transformación mediada por liposomas (como se describe, por ejemplo, en el documento US 4.536.475), y similares. Otros métodos tales como el bombardeo con microproyectiles, como describen Fromm et al. (1990) y Gordon-Kamm et al. (1990) para el maíz, son también adecuados. También se pueden transformar células de plantas monocotiledóneas, tales como las de los principales cereales, usando un tejido embriogénico compacto herido y/o enzimáticamente degradado, capaz de formar un callo embriogénico compacto, o embriones inmaduros heridos y/o degradados como se describe en el documento WO 92/09696. La célula vegetal transformada resultante puede ser luego usada para regenerar de un modo convencional una planta transformada.

La planta transformada obtenida puede ser usada en un esquema de cultivo convencional para producir más plantas transformadas con las mismas características o para introducir el gen quimérico para la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés del invento en otras variedades de la misma especie vegetal o de especies vegetales relacionadas, o en plantas híbridas. Las semillas obtenidas de las plantas transformadas contienen los genes quiméricos del invento como un inserto genómico estable.

Un objeto más del invento es proporcionar células eucarióticas, preferiblemente células vegetales, y organismos (preferiblemente plantas) que comprendan los genes quiméricos para la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico diana como se describe en el invento.

Aún un objeto más del invento es proporcionar células vegetales que comprenden un ácido nucleico de interés que se puede expresar fenotípicamente, que comprenden además una molécula de RNA quimérica que comprende al menos una región de RNA con una secuencia de nucleótidos que incluye:

- i. una secuencia de nucleótidos sentido de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de entre 75 y 100% con al menos parte de una región de codificación del ácido nucleico de interés; y
- ii. una secuencia de nucleótidos antisentido que incluye al menos 10 nucleótidos consecutivos, que tiene una identidad de secuencia de entre aproximadamente 75% y aproximadamente 100% con el complemento de los al menos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos sentido, y capaz de formar un RNA de doble cadena por apareamiento de bases con la secuencia de nucleótidos sentido;

en que dicho ácido nucleico de interés es un gen integrado en el genoma de dicha célula eucariótica, y

en que la expresión fenotípica del ácido nucleico de interés está significativamente reducida por la presencia de la molécula de RNA en comparación con la expresión fenotípica del ácido nucleico de interés en ausencia de la molécula de RNA. La molécula de RNA puede ser codificada por DNA quimérico. Las realizaciones preferidas para las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido, particularmente en cuanto a la longitud y la secuencia, son como se mencionan en otra parte de esta memoria descriptiva.

Se apreciará que los métodos y medios descritos en la memoria descriptiva pueden ser también aplicados en métodos de Exploración de Alto Rendimiento (HTS; del inglés, high throughput screening) para la identificación o confirmación de fenotipos asociados con la expresión de una secuencia de ácido nucleico con función hasta ahora no identificada en una célula eucariótica, particularmente en una célula vegetal.

- 5 Dicho método comprende las operaciones de
- 10 1. Seleccionar una secuencia diana dentro de la secuencia de ácido nucleico de interés con una función/fenotipo no identificado o no confirmado cuando se expresa, siendo dicho ácido nucleico de interés un gen integrado en el genoma de dicha célula eucariótica. Preferiblemente, si el ácido nucleico tiene supuestos marcos de lectura abiertos, la secuencia diana debería comprender al menos parte de uno de estos marcos de lectura abiertos. La longitud de la secuencia de nucleótidos diana puede variar desde aproximadamente 10 nucleótidos hasta un valor igual a la longitud (en nucleótidos) del ácido nucleico de interés con función no identificada.
  - 15 2. Diseñar una molécula de RNA que comprenda una secuencia de nucleótidos sentido y una secuencia de nucleótidos antisentido de acuerdo con el invento.
  - 20 3. Introducir la molécula de RNA que comprende las secuencias de nucleótidos tanto sentido como antisentido diseñadas sobre la base de la secuencia diana, en una célula huésped adecuada, particularmente una célula vegetal, que comprende el ácido nucleico con la secuencia de nucleótidos con un fenotipo hasta ahora no identificado. El RNA se puede introducir directamente o se puede introducir por medio de un DNA quimérico que comprende un promotor operativo en la célula huésped de interés, particularmente un promotor expresable en plantas, y una región de DNA que actúa como una adecuada señal (terminador) de poliadenilación y formación de extremos 3' en la célula huésped, con una región de DNA intermedia que se puede transcribir para producir la molécula de RNA que comprende las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido. El DNA quimérico se puede introducir transitoriamente o se puede integrar en el genoma nuclear. El DNA quimérico se puede proporcionar también sobre un vector vírico (véanse, por ejemplo, los documentos WO 95/34668 y WO 93/03161).
  - 25 4. Observar el fenotipo mediante un método adecuado. Dependiendo del fenotipo esperado, puede resultar suficiente el observar o medir el fenotipo en una sola célula, pero también puede ser necesario cultivar las células para obtener un nivel multicelular (organizado), o incluso regenerar un organismo transgénico, particularmente una planta transgénica.

35 En su realización más sencilla, la molécula de RNA que comprende las secuencias de nucleótidos tanto sentido como antisentido para al menos parte de un ácido nucleico de interés, adecuada para los métodos del invento, puede ser obtenida clonando dos copias de una región de DNA con la secuencia diana seleccionada en una orientación de repetición invertida (preferiblemente separadas por una región de DNA corta que no contiene una señal de terminación de la transcripción y codifica la secuencia espaciadora) bajo un promotor adecuado. Luego se usa este DNA quimérico como un DNA molde en un método de transcripción *in vitro* para generar la molécula de RNA, que se introduce en la célula huésped, o se introduce el propio DNA quimérico en la célula huésped.

45 Los métodos y medios del invento pueden ser así usados para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico en una célula u organismo eucariótico, particularmente una célula vegetal o una planta, para obtener resistencia al desprendimiento de partes vegetales (documento WO 97/13865), para obtener patrones modificados de los colores de las flores (documentos EP 522880, US 5.231.020), para obtener plantas resistentes a nematodos (documentos WO 92/21757, WO 93/10251, WO 94/17194), para retrasar la maduración de los frutos (documentos WO 91/16440, WO 91/05865, WO 91/16426, WO 92/17596, WO 93/07275, WO 92/04456, US 5.545.366), para obtener esterilidad masculina (documentos WO 94/29465, WO 89/10396, WO 92/18625), para reducir la presencia de metabolitos indeseados (secundarios) en organismos, tal como el contenido de glucosinolatos (documento WO 97/16559) o clorofila (documento EP 779364) en plantas, para modificar mediante ingeniería metabólica el perfil de metabolitos sintetizados en una célula u organismo eucariótico, por ejemplo, reduciendo la expresión de genes particulares implicados en el metabolismo de hidratos de carbono (documentos WO 92/11375, WO 92/11376, US 5.365.016, WO 95/07355) o la biosíntesis de lípidos (documentos WO 94/18337, US 5.530.192), para retrasar el envejecimiento (documento WO 95/07993), para alterar la lignificación en las plantas (documentos WO 93/05159, WO 93/05160), para alterar la calidad de las fibras en el algodón (documento US 5.597.718), para aumentar la resistencia a las machacaduras en las patatas al reducir la polifenol oxidasa (documento WO 94/03607), etc.

60 Los métodos del invento conducirán a mejores resultados y/o mayores eficacias en comparación con los métodos en que se usan secuencias de nucleótidos sentido o antisentido convencionales, y se cree que otros mecanismos secuencialmente específicos que regulan la expresión fenotípica de ácidos nucleicos diana podrían estar implicados y/o ser desencadenados por la presencia de las moléculas de RNA de doble cadena descritas en esta memoria descriptiva.

65 Una aplicación particular para la reducción de la expresión fenotípica de un transgén en una célula vegetal, inter alia, por métodos antisentido o sentido, ha sido descrita para el restablecimiento de la fertilidad masculina, obteniéndose

éste por introducción de un transgén que comprende un DNA de esterilidad masculina (documentos WO 94/09143, WO 91/02069). El ácido nucleico de interés es específicamente el DNA de esterilidad masculina. De nuevo, los procedimientos y productos descritos en este invento se pueden aplicar a estos métodos con objeto de llegar a un establecimiento más eficaz de la fertilidad masculina.

5 Los métodos y medios del invento que atañen a moléculas de RNA que comprenden un RNA en horquilla y a los genes quiméricos de codificación han demostrado ser particularmente adecuados para la modificación de la composición del contenido de aceite en plantas, particularmente en semillas. Las plantas particularmente preferidas son plantas agrícolas utilizadas para la producción de aceite, tales como, pero sin limitarse a, colza de semilla oleagino-  
10 sa (*Brassica juncea*, *napus*, *rapa*, *oleracea*, *campestris*), maíz, algodón, cacahuete, girasol, semillas de ricino, lino, coco, linaza y soja. Los genes diana preferidos son los genes de desaturasa, particularmente genes de codificación de  $\Delta 12$  desaturasa tales como los codificados por los genes *Fad2*, especialmente los genes cuya secuencia de nucleótidos puede hallarse en la Genbank Database bajo el número de acceso AF123460 (de *Brassica carinata*), AF12042841 (*Brassica rapa*), L26296 (*Arabidopsis thaliana*) o A65102 (*Corylus avellana*). Es evidente que dentro  
15 del alcance de la persona experta en la técnica está el obtener de otras especies, mediante, por ejemplo, técnicas de hibridación y/o PCR, genes homólogos a los genes *fad2* descritos.

Las realizaciones preferidas para la configuración de secuencias de nucleótidos sentido y antisentido, particularmente en lo relativo a la longitud y la secuencia, son como se mencionan en otra parte de esta memoria descriptiva. Además, las realizaciones preferidas para los genes quiméricos que codifican moléculas de RNA que contienen horquillas, particularmente en lo relativo a los elementos promotores, son como se describen en otra parte de la memoria descriptiva. Para esta solicitud, se prefiere particularmente que los promotores sean promotores específicos de semillas.

25 En una realización preferida, la molécula de RNA que comprende RNA artificial en horquilla comprende así parte de un ORF que codifica la  $\Delta 12$  desaturasa, en orientación sentido, y una parte similar en orientación antisentido, preferiblemente separadas por una secuencia espaciadora. En una realización particularmente preferida, el RNA artificial en horquilla (o su gen quimérico de codificación) comprende la secuencia de nucleótidos de ID. SEC. nº 6 o una secuencia de nucleótidos similarmente construida basada en los susodichos genes *fad2* de *Brassica*.

30 Preferiblemente, el gen quimérico que codifica el RNA artificial en horquilla es transcrito bajo el control de un promotor específico de semillas, particularmente bajo el control del promotor FP1 como se describe en otra parte de esta solicitud.

35 Una reducción de la expresión del gen de la  $\Delta 12$  desaturasa en plantas que contienen aceite conduce a un aumento de ácido oleico y a una concomitante disminución de ácido linolénico y ácido linoleico. Utilizando los medios y métodos del invento, se encuentra una mayor frecuencia de plantas con aceite en que son significativos el aumento de ácido oleico y la concomitante disminución de ácidos linolénico y linoleico, que en plantas transgénicas que portan construcciones de cosupresión comunes. Además, los respectivos niveles absolutos de aumento y disminución son respectivamente mayores y menores que en plantas transgénicas que portan construcciones de cosupresión comunes.

40 De este modo, usando los medios y métodos del invento, es posible obtener plantas y semillas que comprendan un aceite cuya composición, después de la trituración y la extracción, tenga un contenido aumentado de ácido oleico (expresado como porcentaje de la composición total de ácidos grasos), particularmente un aumento de tres órdenes de magnitud, en comparación con plantas testigo.

45 Se espera que, utilizando los métodos y medios del invento, se pueda obtener una planta transgénica de *Brassica* cuyas semillas comprendan un aceite en que el contenido de ácido oleico exceda del 90% del contenido total de ácidos grasos.

Los métodos y medios del invento serán adecuados para obtener resistencia a virus en células u organismos eucarióticos.

55 Los métodos y medios del invento permiten además el uso de genes víricos, hasta ahora no utilizados para obtener plantas resistentes a virus, además de los genes de proteínas de envoltura o genes de replicasa comúnmente usados.

60 Es evidente que el invento será especialmente adecuado para la reducción de la expresión fenotípica de genes que pertenecen a familias multigénicas.

También es evidente que los métodos y medios del invento son adecuados para la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico en todas las células vegetales de todas las plantas, sean plantas monocotiledóneas o sean dicotiledóneas, particularmente plantas agrícolas tales como, pero sin limitarse a, maíz, arroz, trigo, cebada, caña de azúcar, algodón, colza de semilla oleaginosa, soja, vegetales (incluyendo achicoria, vegetales de *Brassica*, lechuga y tomate), tabaco, patata y remolacha azucarera, pero también plantas utilizadas en horticultura, floricultura o silvi-

cultura. Los medios y métodos del invento serán particularmente adecuados para plantas que tienen genomas complejos, tales como las plantas poliploides.

5 Se espera que las moléculas de RNA quiméricas producidas por transcripción de los genes quiméricos aquí descritos puedan propagarse sistémicamente por toda una planta, y, de esta manera, sea posible reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico en células de un vástago no transgénico de una planta injertado en un tronco transgénico que comprende los genes quiméricos del invento (o viceversa), un método que puede ser importante en horticultura, viticultura o producción frutícola.

10 Los siguientes ejemplos no restrictivos describen la construcción de genes quiméricos para la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés en una célula eucariótica, y el uso de dichos genes. A menos que se indique otra cosa en los ejemplos, todas las técnicas de DNA recombinante se llevan a cabo de acuerdo con protocolos estándares, como se describe en Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU., y en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994), *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols*, EE.UU. En *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) de R. D. D. Croy, conjuntamente publicado por BIOS Scientific Publications Ltd. (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications (Reino Unido), se describen materiales y métodos estándares para trabajos moleculares con plantas.

20 A lo largo de la descripción y los ejemplos se hace referencia a las secuencias siguientes:

ID. SEC. nº 1: secuencia del fragmento del gen Nia del virus Y de la patata, usado para la construcción de diversas construcciones sentido y antisentido para obtener resistencia a virus.

25 ID. SEC. nº 2: secuencia de la región de codificación de la construcción CoP de GUSd del Ejemplo 1.

ID. SEC. nº 3: secuencia de una región 5' no traducida (5'UTR; del inglés, 5' *untranslated region*) modificada, del virus del mosaico del *Sorghum halepense*.

30 ID. SEC. nº 4: secuencia del promotor nº 4 del virus del trébol subterráneo con el potenciador S7.

ID. SEC. nº 5: secuencia del doble potenciador-promotor nº 4 del virus del trébol subterráneo.

ID. SEC. nº 6: secuencia de la construcción CoP para la inhibición de la expresión del gen de la  $\Delta 12$  desaturasa.

35 ID. SEC. nº 7: secuencia del intrón de la piruvato ortofosfato dicinasa de *Flaveria trinervia*.

Se incluye el siguiente texto libre en la enumeración de secuencias:

40 <223> **Fragmento del ORF de Nia**

<223> **Descripción de secuencia artificial: región de codificación de la construcción CoP de GUSd**

<223> **Región de codificación de GUS deficiente**

45

<223> **Antisentido con respecto al extremo 5' de la región de codificación de GUS**

<223> **Descripción de secuencia artificial: 5'UTR del virus del mosaico del *Sorghum halepense*.**

50 <223> **Descripción de secuencia artificial: promotor S4 del virus del trébol subterráneo con el potenciador S7**

<223> **Descripción de secuencia artificial: promotor S4 del virus del trébol subterráneo con el potenciador S4**

55

<223> **Descripción de secuencia artificial: secuencia de codificación de la construcción CoP de desaturasa**

60 <223> **Correspondiente al extremo 5' de la región de codificación de la delta12-desaturasa (fad2), en orientación sentido**

<223> **Correspondiente al extremo 5' de la región de codificación de la delta12-desaturasa (fad2), en orientación antisentido**

**<223> Descripción de secuencia artificial: intrón 2 de la piruvato ortofosfato dicinasa de *Flaveria trinervia***

Los ejemplos siguientes se presentan con objeto de ilustrar más plenamente las realizaciones preferidas del invento. Sin embargo, no deben ser considerados en modo alguno restrictivos del amplio alcance del invento.

5

**EJEMPLOS****Procedimientos experimentales**10 **Construcción génica**

Se usaron métodos de clonación génica estándares (Sambrook et al., 1989) para preparar los genes quiméricos. En las Figuras 1A y 1B se muestra una representación esquemática de las construcciones usadas.

15 Los componentes para estas construcciones fueron:

\* Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, procedente del producto de aislamiento Cabb-JI (35S) (Harps-ter et al., 1988)

20 \* Terminador de la octopina sintasa (ocs-t) (MacDonald et al., 1991)

\* Promotor nº 4 (S4) del virus del trébol subterráneo (documento WO 9606932)

25 \* Terminador nº 4 (s4t) del virus del trébol subterráneo (documento WO 9606932)

\* Doble potenciador-promotor nº 4 (S4S4) del virus del trébol subterráneo (ID. SEC. nº 5)

\* Promotor nº 4 del virus del trébol subterráneo con el potenciador S7 (S7S4) (ID. SEC. nº 4)

30 \* Promotor de la ubicuitina (Ubi) del maíz (Christensen y Quail, 1996)

\* Terminador del gen de morfología tumoral 1 (tm1') de *Agrobacterium* (Zheng et al., 1991)

35 \* El gen Nia de una cepa australiana del virus Y de la patata (Nia) (ID. SEC. nº 1)

\* Un DNA que codifica un marco de lectura abierto de  $\beta$ -glucuronidasa disfuncional (GUSd) (ID. SEC. nº 2, del nucleótido 1 al nucleótido 1581)

40 \* Una región 5' no traducida (5'UTR) modificada, del virus del mosaico del *Sorghum halepense* (JGMV5'; del inglés, Johnsongrass mosaic virus 5') (ID. SEC. nº 3). Ésta contiene la inserción de un sitio *NcoI* en el codón ATG de inicio, seguido de tres codones de parada en marco, y un sitio *PstI* (para la inserción del intrón como en las construcciones 4 y 5 de la Figura 1A). En las construcciones vector 2 y 6 de la Figura 1A, el marco de lectura abierto de GUSd se inserta en el sitio *NcoI*, separando los codones de parada; en todas las demás construcciones de la Figura 1A se inserta cadena abajo del sitio *PstI*.

45 \* Un intrón de catalasa de semillas de ricino (Ohta et al., 1990), del modo modificado por Wang et al. (1997) ("intrón")

50 Los genes quiméricos se construyeron ensamblando operativamente las diferentes partes de la manera esquemáticamente indicada en la Figura 1A o la Figura 1B e insertando los obtenidos genes quiméricos en los vectores pART27 y pART7 de vectores de T-DNA (Gleave, 1992) entre el borde izquierdo de T-DNA y el gen quimérico *neo* expresable en plantas.

55 El DNA que codifica un marco de lectura abierto de  $\beta$ -glucuronidasa disfuncional (GUSd) fue obtenido suprimiendo, de una región de codificación de *gus*, la secuencia entre los dos sitios de restricción *EcoRV*. Para la construcción del gen quimérico que codifica la molécula de RNA que comprende las secuencias de nucleótidos tanto sentido como antisentido para un gen de  $\beta$ -glucuronidasa, se añadió una secuencia al gen GUSd para permitir el apareamiento de bases del extremo 5' a lo largo de 558 bases para dar lugar a una secuencia como la representada en la ID. SEC. nº 2. Esta secuencia fue clonada entre el promotor de la ubicuitina de maíz y el terminador tm1' e insertada en un vector de T-DNA.

60

Se construyeron vectores de T-DNA que comprendían unos genes quiméricos primero y segundo de resistencia a virus, en que el primer gen quimérico consistía en:

65 1. una secuencia del promotor CaMV 35S, copulada con,

2. en orientación sentido, la secuencia de nucleótidos del PVY que codifica

- la proteína Vpg (véase, por ejemplo, el número de acceso ZZ9526 de Genbank, del nucleótido 1013 al nucleótido 1583), o
- parte de la proteína CI (véase, por ejemplo, el número de acceso M95491 de Genbank, del nucleótido 3688 al nucleótido 4215), o
- proteasa (Pro) (véase, por ejemplo, el número de acceso D00441 de EMBL, del nucleótido 5714 al nucleótido 7009), seguida de

3. el terminador S4 del virus del mosaico del trébol subterráneo, como se describió anteriormente.

El segundo gen quimérico consiste en

1. un promotor S4 como el anteriormente descrito, copulado con,
2. en orientación antisentido, la secuencia de nucleótidos del PVY que codifica
  - la proteína Vpg, o
  - la proteína CI, o
  - proteasa, seguida de
3. el terminador de la octopina sintasa, como se describió anteriormente.

Las secuencias sentido y antisentido situadas dentro de un vector de T-DNA procedían de la misma región de codificación del PVY.

Además, se construyeron vectores de T-DNA para uso en la alteración de la composición de ácidos grasos en un aceite (véase la Figura 2), que comprendían

1. un promotor FP1 (promotor truncado de la napina, específico de semillas, que contiene secuencias entre -309 y +1, como describen Stalberg et al.); enlazado con
2. la secuencia de nucleótidos de ID. SEC. nº 6, que comprende las 480 bp situadas en 5' en el ORF que codifica la  $\Delta 12$  desaturasa de *Arabidopsis thaliana* (Fad2), en orientación sentido y en orientación antisentido, enlazada por una secuencia espaciadora de 623 bp; seguida de
3. el terminador del gen de la nopalina sintasa.

Además, se construyeron vectores de T-DNA para evaluar la influencia de la presencia de una secuencia intrónica en los genes quiméricos que codifican construcciones CoP. Con este fin se prepararon construcciones que comprendían:

1. un promotor CaMV 35S, seguido de
2. el ORF de PVY que codifica proteasa (véase más atrás), en orientación sentido;
3. la secuencia de ID. SEC. nº 7 (que codifica el intrón 2 de la piruvato ortofosfato dicinasa de *Flaveria trinervia*);
4. el ORF de PVY que codifica proteasa, en orientación antisentido; y
5. el terminador del gen de la octopina sintasa.

#### Transformación de plantas

Se transformó tejido de *Nicotiana tabacum* (W38) y se regeneró en plantas completas esencialmente del modo descrito por Landsman et al. (1988). Se transformó arroz (*Oryza sativa*) esencialmente del modo descrito por Wang et al. (1997).

#### Supertransformación de arroz

Se extrajeron embriones maduros de una semilla madura de una planta de arroz que expresaba actividades GUS e higromicina fosfotransferasa (HPT) y se pusieron en medios inductores de callo durante 7 semanas. Se recuperaron

callos de estos cultivos, se incubaron durante 2 días con agrobacterias que contenían diversas construcciones vector binarias y se pusieron luego en medios inductores de callo que contenían higromicina, bialafos y Timentin™. Durante las cuatro semanas siguientes se desarrollaron callos resistentes a higromicina y bialafos. Estas líneas de callo se mantuvieron en medios que contenían higromicina y bialafos durante otros 2 meses antes de ser examinadas en cuanto a actividad GUS.

Ensayo de GUS

Se examinaron callos de arroz en cuanto a la actividad GUS utilizando el tinte histoquímico X-glucuronido o el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferona-glucuronido (MUG) esencialmente de la manera descrita por Jefferson et al. (1987).

**EJEMPLO 1. Comparación de genes quiméricos que comprenden sólo secuencia antisentido, sólo secuencia sentido, o tanto secuencia sentido como antisentido [Par complementario (CoP)], en cuanto a la reducción de la expresión fenotípica de un gen integrado de β-glucuronidasa.**

Un tejido de arroz transgénico que expresaba β-glucuronidasa (GUS) a partir de un solo transgén (y resistencia a higromicina a partir de un gen *hph*) (líneas V10-28 y V10-67) fue supertransformado usando vectores que contenían el gen *bar* que confiere resistencia a fosfinotricina y diversas construcciones sentido, antisentido y CoP (véase la Figura 1A) derivadas de un gen GUS deteriorado (GUSd). El tejido supertransformado fue mantenido en medios de selección de higromicina y bialafos durante 3 semanas y fue luego analizado en cuanto a actividad GUS. Se utilizó un gen GUS deteriorado para que la expresión de este gen no se superpusiera a la actividad GUS endógena.

Las cifras de la Tabla 2 representan la velocidad de producción de MU medida por absorción a 455 nm, con excitación a 365 nm, de 1,5 µg de proteína total en un volumen de reacción de 200 µl. La velocidad se midió durante 30 minutos a 37 °C. La lectura de los callos de arroz no transgénico fue 0,162. Las cifras entre paréntesis que siguen a la descripción de la construcción introducida se refieren a la Figura 1A.

Los resultados (Tabla 2) mostraron que la supertransformación con el vector binario que contenía el gen *bar* sin el gen GUSd no ejercía efecto de silenciamiento sobre la actividad GUS endógena. La supertransformación con GUSd en una orientación sentido o antisentido, con o sin un intrón o un codón de parada precoz, mostró cierto grado de reducción (en aproximadamente el 25% de los callos analizados) de la actividad GUS endógena (véanse las dos últimas filas de la Tabla 2, que representan el porcentaje de callos analizados con una lectura inferior a 2000 en el ensayo MUG). Sin embargo, la supertransformación con una construcción CoP proporcionó una reducción de la actividad GUS endógena en aproximadamente del 75% al 100% de los callos analizados. Esta construcción CoP fue diseñada de modo que el extremo 3' del mRNA producido pudiera formar un dúplex con el extremo 5' del transcrito para proporcionar una estructura de "mango de sartén".

Estos datos muestran que se puede preparar una pareja complementaria utilizando un transcrito autohibridante, que este diseño es mucho más eficaz que una construcción sentido o antisentido convencional, y que se puede utilizar el planteamiento para reducir la expresión fenotípica de genes presentes en una célula vegetal.

**Tabla 2.** Ensayo MUG de callos de arroz supertransformado

	Casete vector (1)	Sentido (2)	Sentido + parada (3)	Sentido + parada + intrón (4)	Antisentido + parada + intrón (5)	CoP de repetición invertida (6)
V10-28	121,0	97,45	38,43	38,88	<u>0,290</u>	<u>0,565</u>
	45,58	6,637	64,16	115,5	<u>0,572</u>	<u>0,316</u>
	99,28	71,60	149,2	133,0	37,2	<u>0,351</u>
	26,17	<u>0,224</u>	<u>0,955</u>	98,46	53,94	<u>0,210</u>
	92,21	<u>0,321</u>	68,32	<u>0,502</u>	105,5	<u>0,701</u>
	108,8	5,290	105,6	39,35	56,73	<u>0,733</u>
	6,432	<u>0,9460</u>	136,6	<u>1,545</u>	60,36	2,103
	90,80	32,44	140,4	10,36	71,12	119,8
	98,24	128,8	62,38	111,6	13,17	<u>0,717</u>
	93,76	31,28	17,79	14,42	<u>0,424</u>	<u>0,398</u>
		5,023		88,06	26,98	<u>0,315</u>
		40,27		52,28	115,5	<u>0,270</u>
		36,40		30,26	149,7	16,78
		53,24		107,5	66,75	67,28
		29,97		26,75	145,8	<u>0,217</u>
		89,06		105,1	<u>0,534</u>	<u>0,208</u>
		<u>0,256</u>		135,1	9,4	
		68,23		95,04	35,33	
		5,481		71,5		

V10-67	318,8	93,43	<u>0,199</u>	31,82	<u>1,395</u>	<u>0,472</u>
	109,5	73,19	<u>0,197</u>	58,08	152,4	<u>0,256</u>
	30,35	128,1	<u>0,157</u>	56,32	67,42	<u>0,296</u>
	40,04	<u>1,506</u>	128	44,62	12,11	<u>0,452</u>
	228	140,6	130,3	<u>0,454</u>	<u>0,668</u>	<u>0,422</u>
	23,05	<u>1,275</u>	196,2	17,32	23,34	<u>0,196</u>
	241,2	<u>0,272</u>	12,43	73,2	76,10	<u>0,294</u>
	118,5	<u>0,209</u>	140,0	20,32	130,1	<u>0,172</u>
	11,27	<u>42,05</u>	90,13	107,4	<u>0,841</u>	<u>0,436</u>
	110,6	117,5	157,4	<u>0,453</u>	66,12	<u>0,398</u>
	19,29	118,9	<u>0,518</u>	87,81	136,9	<u>0,242</u>
	121,0	21,44	<u>0,231</u>	<u>0,299</u>	67,92	
	115,1	155,0	116,1	<u>0,206</u>	50,32	
	77,1	190,9	43,18	12,47	170,3	
	106,1	<u>0,773</u>	31,06	<u>0,213</u>	108,9	
	73,12	<u>0,146</u>		<u>11,15</u>	<u>1,241</u>	
	29,97			19,22	4,092	
	50,11				169,6	
	80,34				76,88	
	117,8				22,08	
	159,1				91,6	
	67,52				7,855	
	92,32				69,76	
	27,97				<u>0,822</u>	
V10-28	0%	21%	10%	10,5%	22%	75%
V10-67	0%	37,5%	33%	29,5%	21%	100%

**EJEMPLO 2 (Comparativo). Comparación de la eficacia de utilización de genes quiméricos que comprenden sólo genes antisentido, sólo genes sentido o simultáneamente ambos genes para obtener resistencia a virus en plantas transgénicas.**

5 Se prepararon construcciones génicas utilizando la secuencia de codificación de la proteasa de PVY (ID. SEC. nº 1) en una orientación sentido, una orientación antisentido y una orientación de par complementario (CoP), en que el T-DNA comprendía los genes quiméricos tanto sentido como antisentido bajo el control de su propio promotor. En las  
10 después de las disposiciones se utilizó el promotor CaMV 35S. Se prepararon cinco versiones diferentes de construcciones CoP en que el segundo promotor era el promotor CaMV 35S, el promotor S4, el promotor S4 doble, el promotor S4-potenciador S7, o el promotor *rolC* específico vascular (véase la Figura 1B).

15 Se transformaron estas construcciones en tabaco (por medio de transferencia de DNA mediada por *Agrobacterium*) y se recuperaron aproximadamente 25 plantas, independientemente transformadas, por construcción génica quimérica. Las plantas transgénicas fueron transferidas a tierra y mantenidas en un invernadero. Aproximadamente 1 mes después del trasplante en la tierra, se inoculó manualmente el virus Y de la patata a las plantas utilizando métodos de aplicación estándares. Dos y cuatro semanas más tarde, las plantas fueron calificadas en cuanto a síntomas del virus. Los resultados (Tabla 3) mostraron que, después de 1 mes, no mostraron síntomas 2 de las 27 plantas que comprendían sólo el gen sentido y 1 de las 25 plantas que comprendían sólo el gen antisentido.

20 Por contraste, respectivamente, no mostraron síntomas 11 de 24 (construcción Nia-35S/Nia antisentido-S4), 7 de 25 (construcción Nia-35S/Nia antisentido-RolC), 10 de 27 (construcción Nia-35S/Nia antisentido-35S), 7 de 26 (construcción Nia-35S/Nia antisentido-S4S4) y 7 de 25 (construcción Nia-35S/Nia antisentido-S7S4) plantas que contenían los genes tanto sentido como antisentido. Se consideró que las plantas que no mostraban síntomas mostraban una resistencia extrema al PVY. Continuaron sin mostrar síntomas durante 2 meses más de control [plantas indicadas como "extremadamente resistentes" (ER) en la Tabla 3].

30 Algunas otras plantas, particularmente aquellas que contenían construcciones CoP, mostraron un retraso y una restricción de síntomas. No mostraron síntomas 2 semanas después de la inoculación, pero se vieron algunas lesiones menores en algunas plantas después de 4 semanas. Estas plantas resultaron evidentemente mucho menos afectadas por el PVY que los tabacos no transgénicos o susceptibles y fueron calificadas como resistentes (indicadas como ER\* en la Tabla 3).

35 **Tabla 3.** Resistencia de plantas de tabaco transgénicas que comprenden la construcción quimérica sentido de proteasa de PVY, la construcción quimérica antisentido de proteasa de PVY, o ambas (diferentes construcciones CoP) a una infección por el PVY.

Gen sentido	Gen antisentido	Plantas extremadamente resistentes (ER)	Plantas "resistentes" (ER*)	Número total de plantas transgénicas
Nia-35S		2	2	27
	Nia antisentido-35S	1	0	25
Nia-35S	Nia antisentido-35S	10	2	27
Nia-35S	Nia antisentido-S4	11	2	24
Nia-35S	Nia antisentido-RolC	7	3	25
Nia-35S	Nia antisentido-S4S4	7	7	26
Nia-35S	Nia antisentido-S7S4	7	4	25

Los datos muestran que el uso de construcciones CoP da lugar a una frecuencia mucho mayor de plantas transgénicas con resistencia extrema y resistencia que el uso de construcciones sentido o antisentido solas.

5 A continuación, se determinó el número de copias de los transgenes en las plantas transgénicas resistentes a virus. Por lo tanto, se extrajo DNA de todas las plantas transgénicas que mostraban resistencia extrema o resistencia. También se extrajo DNA de cinco plantas susceptibles para cada construcción. Se examinó el DNA en cuanto al número de copias génicas utilizando un análisis Southern. Los datos (Tabla 4) mostraron que los genomas de algunas de las plantas CoP que mostraban una resistencia extrema, particularmente las plantas Nia-35S/Nia antisentido-S4, sólo contenían una única copia de la construcción génica.

10 **Tabla 4.** Número de copias de los transgenes que comprenden la construcción quimérica sentido de proteasa de PVY, la construcción quimérica antisentido de proteasa de PVY, o ambas (diferentes construcciones CoP) en plantas extremadamente resistentes, resistentes y susceptibles.

Gen sentido	Gen antisentido	Plantas extremadamente resistentes (ER)	Plantas "resistentes" (ER*)	Plantas susceptibles
Nia-35S		6	1	1/1/1/1/1
	Nia antisentido-35S	4	–	1/8/0/2/1
Nia-35S	Nia antisentido-35S	3/1/2/3/6/3/2/4/2/3	1/1	1/2/2/6/1
Nia-35S	Nia antisentido-S4	2/4/1/3/2/4/6/1/1/3/1	2/6	5/8/2/3
Nia-35S	Nia antisentido-RolC	6/7/6/7/7/7/6	2/1	2/2/2/1/2
Nia-35S	Nia antisentido-S4S4	1/2/4/5/2/2/2	1/1/2/1/1/1/1	1/1/7/1/1
Nia-35S	Nia antisentido-S7S4	2/4/12/5/2/2/7	3/2/1/2	1/1/3/1/1

### EJEMPLO 3 (Comparativo). Herencia de resistencia extrema en plantas del Ejemplo 2.

20 Se dejó que plantas del Ejemplo 2 se autofertilizaran y se recolectaron sus semillas. Las semillas que procedían de plantas que mostraban resistencia extrema y bajo número de copias transgénicas para construcciones CoP Nia-35S/Nia antisentido-S4 y Nia-35S/Nia antisentido-35S y las semillas de las plantas sentido y antisentido que mostraban resistencia extrema fueron dejadas germinar y cultivadas en el invernadero. También se cultivaron plantas a partir de semillas recolectadas de dos líneas CoP susceptibles, dos únicas líneas génicas sentido susceptibles y dos únicas líneas génicas antisentido susceptibles. Se seleccionaron veinte plantas de cada línea en cuanto a uniformidad global del tamaño y la fase de desarrollo, se pusieron en macetas individuales y se dejaron recuperar durante una semana, y luego se les inoculó el PVY. Se calificaron las plantas en cuanto a síntomas virales 2, 4 y 7 semanas después de la inoculación. Los resultados (Tabla 5) mostraron que las ocho líneas vegetales de Nia-35S/Nia antisentido-S4 y Nia-35S/Nia antisentido-35S que contenían una o dos copias génicas mostraban una relación de segregación de resistencia extrema:susceptibilidad de aproximadamente 3:1. La progenie de la única línea de un solo gen antisentido que había dado resistencia extrema a  $T_0$  y la progenie de la planta sentido extremadamente resistente que contenía una copia génica proporcionaron relaciones de segregación anormales (2:18, ER:susceptible). La progenie de la única planta sentido que proporcionaba resistencia extrema y contenía 6 copias génicas proporcionó una relación ~3:1 (ER:susceptible). Toda la progenie de las plantas  $T_0$  susceptibles mostró una susceptibilidad completa al PVY.

35 Estos datos muestran que la resistencia extrema de las construcciones CoP proporciona una expresión estable de la resistencia, que se hereda de un modo mendeliano. Esto también indica que, en estas líneas, los loci génicos CoP de PVY son ~100% eficaces para conferir resistencia extrema mientras que los loci transgénicos de la línea antisentido y una de las dos líneas sentido son sólo parcialmente eficaces para conferir resistencia extrema.

Tabla 5

	Nia sentido 35S y Nia antisentido-S4		Nia sentido 35S y Nia antisentido-S4		Nia sentido 35S		Nia antisentido 35S	
	Nº de copias	T1 ER:S	Nº de copias	T1 ER:S	Nº de copias	T1 ER:S	Nº de copias	T1 ER:S
Planta ER 1	1	15:5	1	16:4	6	17:3	4	2:18
2	1	12:8	2	15:5	1	2:18		
3	1	14:6	2	16:4				
4	1	15:5	2	16:4				
Planta susceptible 1	8	0:20	1	0:20	1	0:20	1	0:20
2	2	0:20	1	0:20	1	0:20	8	0:20

5 **EJEMPLO 4 (Comparativo). Tabaco transgénico extremadamente resistente a virus, con diferentes componentes (gen sentido y gen antisentido) en diferentes loci dentro de la planta transgénica.**

10 Se cruzaron plantas susceptibles al PVY que contenían el transgén sentido (que contenían copias únicas del transgén; véase la Tabla 6), con plantas susceptibles al PVY que contenían el transgén antisentido (que también habían sido analizadas por análisis Southern en cuanto al número de copias; véase la Tabla 6). Se propagaron veinte individuos de la progenie resultante por cruce en el invernadero y luego se les inoculó el PVY y se les calificó en cuanto a infección vírica del modo descrito en el Ejemplo 2. Se esperaba que la progenie de los cruces (entre plantas que contenían genes/loci únicos) estuviera en la relación siguiente:  $\frac{1}{4}$  con gen sentido solo,  $\frac{1}{4}$  con gen antisentido solo,  $\frac{1}{4}$  que comprendiera tanto el gen sentido como el antisentido, y  $\frac{1}{4}$  que no comprendiera gen alguno. Los resultados (Tabla 4) muestran que, con una excepción, una proporción de la progenie de todos los cruces exitosos 15 mostró resistencia extrema, mientras que ningún individuo de la progenie de las plantas sentido autopolinizadas o antisentido autopolinizadas mostró resistencia extrema. El único cruce que no proporcionó una progenie extremadamente resistente procedió de la planta parental Antisentido 2 (As2) que contenía 8 copias del gen antisentido. Se examinaron las veinte plantas de la progenie de los cruces Sentido 1 (S1) (macho) x Antisentido 1 (As1) (hembra) y Sentido 3 (S3) (hembra) x Antisentido 4 (As4) (macho) mediante análisis Southern. Los resultados mostraron que, 20 en ambos cruces, las plantas que mostraban una resistencia extrema (o, en un caso, resistencia) contenían tanto el gen sentido como el antisentido, mientras que todas las plantas sin transgenes (nulas) o con genes sentido o antisentido solos eran susceptibles al PVY. Para confirmar más esta correlación absoluta entre la presencia de un par complementario (genes sentido con antisentido) en una planta y la resistencia extrema, todas las plantas de la progenie que mostraban resistencia extrema fueron analizadas por transferencias Southern. Los resultados mostraron 25 que cada planta resistente o extremadamente resistente contenía tanto el gen sentido como el antisentido.

Estos datos muestran que un par complementario proporciona resistencia o resistencia extrema aun cuando los genes que codifican los genes sentido y antisentido no estén conjuntamente situados en el genoma. El "fenómeno del par complementario" no se debe simplemente a una dosificación transgénica aumentada ya que se esperaba 30 que  $\frac{1}{4}$  de la progenie autopolinizada fuera homocigota y, por lo tanto, tuviera la dosificación génica duplicada, pero eran susceptibles.

35 **Tabla 6.** Resistencia al PVY de las plantas de la progenie que resulta de los cruces entre plantas de tabaco transgénicas susceptibles que comprenden el gen Nia sentido-35S (líneas S) y plantas de tabaco transgénicas susceptibles que comprenden el gen Nia antisentido-35S (líneas As).

Padre	Madre	Plantas extremadamente resistentes (ER)	Plantas "resistentes" (ER*)
S1	As1	8	
S1	As4	6	5
S2	As4	1	3
S3	As4	3	3
S4	As1	7	1
S3	As5	1	2
S4	As2	0	
S4	As4	2	0
S5	As4	9	4
S5	As5	2	3
As4	As4	0	
As5	As5	0	
S2	S2	0	
S4	S4	0	

Las plantas extremadamente resistentes no mostraron síntomas de infección por PVY después de 7 semanas. Las plantas resistentes mostraron muchas lesiones menores 7 semanas después de la infección por PVY. S1, S2, S3, S4 y S5 son plantas de tabaco transgénicas susceptibles al PVY que comprenden la construcción génica Nia sentido-35S, teniendo todas una copia del transgén integrada.

As1, As2, As4 y As5 son plantas de tabaco transgénicas susceptibles al PVY que comprenden la construcción génica Nia antisentido-35S, que tienen, respectivamente, 1, 8, 2 y 1 copias del transgén integradas.

**EJEMPLO 5 (Comparativo). Evaluación del uso de diferentes genes virales como secuencias de ácido nucleico diana en la obtención de genes de resistencia extrema a virus.**

Los vectores de T-DNA que comprenden los genes quiméricos de resistencia a virus primero y segundo basados en secuencias derivadas de la región de codificación de la proteasa o la proteína Vpg o CI de PVY, como se describe en esta solicitud, fueron utilizados para obtener plantas de tabaco transformadas que fueron posteriormente estimuladas con PVY. Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

**Tabla 7**

Construcción	Número de plantas inmunes/número de plantas transgénicas independientes	
	Réplica 1	Réplica 2
35S-Pro sentido/S4-Pro antisentido	11/24	7/25
35S-Vpg sentido/S4-Vpg antisentido	8/20	6/18
35S-CI sentido/S4-CI antisentido	2/23	1/20

**EJEMPLO 6. Silenciamiento intrónico potenciado**

Los vectores de T-DNA que comprenden los genes quiméricos que codifican las construcciones CoP en que se ha insertado un intrón (intrón 2 de la piruvato ortofosfato dicinasa de *Flaveria trinervia*) en la orientación sentido o la orientación antisentido, entre las secuencias sentido y antisentido que corresponden al ORF de PVY que codifica la proteasa (como se describe en otra parte de esta solicitud), fueron usados para obtener plantas de tabaco transformadas que fueron posteriormente estimuladas con PVY. Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

**Tabla 8**

Construcción	Número de plantas inmunes/número de plantas transgénicas independientes
35S-Pro (sentido)-intrón (sentido)-Pro (antisentido)-Ocs-t	22/24
35S-Pro (sentido)-intrón (antisentido)-Pro (antisentido)-Ocs-t	21/24

**EJEMPLO 7. Modificación del perfil de un aceite usando construcciones CoP en *Arabidopsis***

Se utilizaron vectores de T-DNA para modificar la composición de ácidos grasos en un aceite extraído de semillas trituradas, como se describe en otra parte en esta solicitud, para introducir el gen quimérico que codifica la construcción CoP para reducir la expresión (véase la Figura 2A; ID. SEC. n° 6) del gen de la  $\Delta 12$  desaturasa (Fad2) en *Arabidopsis thaliana*.

Para la comparación de la eficacia, se generaron plantas de *Arabidopsis* transgénicas en que la expresión del gen Fad2 estaba reducida por una construcción de cosupresión ordinaria, que comprendía el promotor FP1 específico de semillas conectado al ORF completo del gen de la  $\Delta 12$  desaturasa (Fad2) en *Arabidopsis thaliana* y el promotor de la nopalina sintasa (véase la Figura 2B).

Como plantas testigo, se usaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* transformadas mediante construcciones de T-DNA no relacionadas.

Se recolectaron las semillas, se trituraron y se sometieron a extracción, y se determinó el porcentaje de los ácidos grasos principales en el aceite mediante métodos disponibles en la técnica. Los resultados, que son la media de dos lecturas, se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9

Muestra Nombre	Nombres de los picos ----->											C18:1/( C18:2 + C18:3)	
	Mirístico	Palmítico	Palmitoleico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linoléico	20:0	20:1	22:0	22:1		24:0
Horquilla 1.1	0,00	6,06	0,52	3,21	56,65	7,50	6,82	1,46	16,02	0,00	1,76	0,00	3,95
Horquilla 1.2	0,12	6,86	0,39	3,40	51,28	10,00	8,73	1,64	15,60	0,00	1,97	0,00	2,74
Horquilla 1.3	0,11	8,47	0,50	3,49	21,64	28,99	18,51	2,02	14,19	0,00	2,09	0,00	0,46
Horquilla 1.4	0,00	6,14	0,50	3,37	51,70	9,77	8,02	1,73	16,04	0,00	2,05	0,67	2,91
Horquilla 2.1	0,06	5,19	0,43	3,33	54,84	5,52	7,76	1,77	18,50	0,34	1,83	0,45	4,13
Horquilla 2.2	0,04	7,67	0,46	3,75	19,60	28,29	18,64	2,55	15,96	0,19	2,28	0,56	0,42
Horquilla 3.1	0,00	7,99	0,53	3,62	19,52	28,41	19,24	2,32	15,14	0,00	2,23	0,99	0,41
Horquilla 3.2	0,09	7,00	0,54	3,69	49,02	11,03	9,64	1,71	14,94	0,00	1,72	0,62	2,37
Horquilla 3.3	0,00	5,68	0,49	3,98	46,19	12,82	9,71	2,10	16,70	0,00	1,94	0,39	2,05
Horquilla 3.4	0,17	7,19	0,77	3,69	45,90	11,86	10,65	1,84	15,39	0,00	1,90	0,65	2,04
Horquilla 3.5	0,00	6,45	0,48	3,26	51,76	8,13	10,04	1,51	16,08	0,00	1,92	0,36	2,85
Horquilla 3.6	0,08	7,51	0,23	3,59	19,97	29,13	20,12	2,15	14,54	0,29	2,02	0,36	0,41
Horquilla 3.7	0,14	7,20	0,78	2,90	26,37	24,81	17,18	1,92	15,50	0,36	2,30	0,53	0,63
Horquilla 3.8	0,11	6,34	0,46	3,23	38,58	15,25	13,54	1,89	16,91	0,00	2,36	1,34	1,34
Horquilla 3.9	0,00	6,47	0,49	3,32	47,59	11,44	9,63	1,68	15,96	0,00	1,88	1,55	2,26
Horquilla 3.10	0,00	6,77	0,56	3,48	53,30	7,57	9,34	1,55	15,65	0,00	1,79	0,00	3,15
Horquilla 3.11	0,00	7,05	0,59	3,61	53,62	8,87	8,36	1,55	14,35	0,00	1,99	0,00	3,11
Horquilla 3.12	0,05	8,32	0,36	3,85	18,48	29,24	19,94	2,48	14,75	0,00	2,28	0,26	0,38
Horquilla 4.1	0,09	6,97	0,59	3,61	53,64	8,40	8,44	1,60	15,00	0,00	1,66	0,00	3,19
Horquilla 4.2	0,07	6,81	0,22	3,27	55,06	9,16	8,71	1,26	13,63	0,19	1,33	0,30	3,08
Horquilla 4.3	0,04	6,81	0,50	3,47	46,21	10,67	11,52	1,81	16,50	0,00	1,88	0,58	2,08
Horquilla 5.1	0,00	8,30	0,23	3,71	17,72	28,92	20,63	2,38	14,77	0,00	2,41	0,92	0,36
Horquilla 5.2	0,19	7,15	1,55	3,56	44,58	11,44	11,59	1,77	15,67	0,00	1,84	0,65	1,94
Horquilla 5.3	0,10	6,49	0,40	3,72	54,19	7,01	7,89	1,74	15,91	0,00	1,92	0,62	3,64
Horquilla 5.5	0,12	6,58	0,51	3,84	54,48	6,16	7,23	1,77	16,50	0,42	1,90	0,48	4,07
Horquilla 5.6	0,00	6,67	0,50	3,66	46,32	11,56	10,48	1,83	15,99	0,00	2,15	0,84	2,10
Horquilla 5.7	0,00	5,50	0,51	3,58	57,33	4,75	5,91	1,75	18,03	0,00	1,88	0,76	5,38
Horquilla 5.8	0,16	6,55	1,53	3,54	48,52	9,91	8,97	1,78	16,39	0,00	1,84	0,81	2,57
Horquilla 6.1	0,10	6,35	0,57	3,48	59,00	4,77	6,26	1,48	15,95	0,00	1,80	0,25	5,35

Horquilla 6.2	0,10	7,98	0,37	4,06	20,96	29,01	18,69	2,38	13,63	0,20	2,03	0,60	0,44
Horquilla 6.5	0,08	6,21	0,63	3,61	60,05	5,07	5,27	1,55	15,20	0,00	1,69	0,66	5,81
<b>Muestra</b>	<b>Nombres de los picos -----&gt;</b>												
<b>Nombre</b>	<b>Mirístico</b>	<b>Palmitico</b>	<b>Palmitoleico</b>	<b>Estearico</b>	<b>Oleico</b>	<b>Linoleico</b>	<b>Linolenico</b>	<b>20:0</b>	<b>20:1</b>	<b>22:0</b>	<b>22:1</b>	<b>24:0</b>	<b>C18:1/(C18:2 + C18:3)</b>
Testigo Columbia pBin 19	0,08	8,81	0,47	3,51	17,07	30,31	20,94	1,78	14,56	0,00	2,17	0,28	0,33
Cosupresion 1.1	0,08	8,16	0,62	3,71	26,16	23,77	18,15	2,06	14,65	0,17	1,89	0,57	0,62
Cosupresion 1.2	0,00	8,49	0,53	3,65	17,90	29,93	20,36	2,34	14,25	0,00	2,33	0,23	0,36
Cosupresion 1.3	0,07	6,65	0,40	3,42	38,34	15,25	14,16	1,91	17,19	0,31	1,94	0,35	1,30
Cosupresion 1.4	0,00	8,22	0,57	3,82	18,27	28,82	19,63	2,56	14,83	0,00	2,46	0,83	0,38
Cosupresion 1.5	0,00	7,51	0,52	3,84	34,59	17,90	14,64	2,18	16,27	0,00	2,02	0,54	1,06
Cosupresion 1.6	0,07	7,44	0,47	3,16	23,97	27,32	17,29	2,03	15,52	0,18	2,22	0,33	0,54
Cosupresion 2.1	0,07	7,46	0,43	3,00	23,91	27,21	17,79	1,84	15,27	0,30	2,14	0,58	0,53
Cosupresion 2.2	0,00	8,19	0,55	4,22	18,59	28,31	18,80	2,77	15,51	0,00	2,46	0,58	0,39
Cosupresion 2.3	0,00	8,71	0,47	3,48	19,21	30,06	19,49	2,03	13,78	0,00	2,15	0,63	0,39
Cosupresion 3.1	0,06	7,57	0,50	3,83	32,24	20,00	15,66	2,06	15,65	0,34	1,85	0,23	0,90
Cosupresion 4.1	0,00	7,29	0,43	3,55	30,26	21,17	17,06	2,01	16,08	0,00	1,92	0,25	0,79
Cosupresion 4.2	0,08	8,02	0,53	3,62	33,04	20,04	15,68	1,80	14,72	0,00	1,88	0,58	0,92
Cosupresion 4.3	0,07	8,35	0,54	3,85	30,02	21,72	16,78	2,01	14,25	0,00	1,92	0,49	0,78
Cosupresion 4.4	0,06	6,98	0,53	3,62	43,38	13,24	12,77	1,74	15,37	0,30	1,67	0,33	1,67
Cosupresion 4.5	0,13	7,84	0,52	3,76	33,76	18,16	16,21	1,89	14,96	0,35	1,85	0,57	0,98
Cosupresion 4.6	0,11	8,18	0,32	3,58	19,72	29,19	20,26	2,04	13,92	0,29	1,84	0,55	0,40
Cosupresion 4.7	0,11	7,88	0,39	3,75	27,40	22,85	17,44	2,08	15,29	0,00	2,04	0,76	0,68
Cosupresion 4.8	0,13	7,56	0,41	3,46	32,27	20,50	15,45	1,90	15,47	0,00	2,02	0,83	0,90
Cosupresion 4.9	0,09	7,46	0,29	3,75	36,11	16,96	15,74	1,92	15,38	0,31	1,74	0,25	1,10
Cosupresion 5.1	0,10	7,68	0,34	3,88	36,00	16,77	15,38	1,90	15,44	0,32	1,82	0,36	1,12
Cosupresion 5.2	0,08	7,56	0,25	3,58	26,10	25,11	17,79	1,96	15,03	0,30	1,72	0,54	0,61
Cosupresion 5.3	0,08	7,38	0,20	3,56	42,24	13,33	13,32	1,76	15,19	0,16	1,61	1,18	1,59
Cosupresion 6.1	0,08	8,04	0,50	3,68	31,37	20,29	17,17	1,84	14,31	0,00	1,76	0,95	0,84
Cosupresion 6.2	0,00	8,50	0,51	3,91	18,59	29,33	19,66	2,46	14,75	0,00	2,28	0,00	0,38
Testigo c24 pGNAP-p450	0,07	8,30	0,10	4,78	19,68	25,91	20,56	2,97	15,29	0,31	1,79	0,24	0,42

El análisis de los resultados indica que las plantas transgénicas que portan una construcción CoP (indicada como "horquilla x.x" en la tabla) tienen una mayor frecuencia de plantas con un aceite en que es significativo un aumento de ácido oleico y una concomitante disminución de ácidos linoléico y linoleico, que las plantas transgénicas que portan construcciones de cosupresión. Además, los niveles absolutos de aumento y disminución son respectivamente mayores y menores que en las plantas transgénicas que portan construcciones de cosupresión.

#### **EJEMPLO 7. Modificación del perfil de un aceite usando construcciones CoP en *Brassica***

El vector de T-DNA que porta gen quimérico que codifica la construcción CoP descrita en el Ejemplo 6 es introducido en colza *Brassica* de semilla oleaginosa. Se recolectan las semillas de la *Brassica sp.* transgénica y se trituran, se extrae el aceite y se analiza la composición de los ácidos grasos en el aceite.

El aceite de la *Brassica sp.* transgénica que porta la construcción CoP tiene un contenido significativamente aumentado de ácido oleico y un contenido disminuido de ácidos linoleico y linoléico. Se construye un vector de T-DNA que porta un gen quimérico que codifica una construcción CoP similar a la descrita en el Ejemplo 6 pero en que la secuencia de la región sentido y antisentido que corresponde al ORF que codifica  $\Delta 12$  desaturasa está basada en un ORF homólogo de *Brassica spp.*, y se introduce en colza *Brassica* de semilla oleaginosa.

Las secuencias de los ORFs de *Brassica spp.* homólogos al ORF que codifica la  $\Delta 12$  desaturasa de *Arabidopsis* están disponibles en la base de datos Genbank bajo los números de acceso AF042841 y AF124360.

Se trituran las semillas recolectadas de la *Brassica sp.* transgénica y se extrae el aceite, y se analiza la composición de los ácidos grasos en el aceite. El aceite de la *Brassica sp.* transgénica que porta la construcción CoP tiene un contenido significativamente aumentado de ácido oleico y un contenido disminuido de ácidos linoleico y linoléico.

#### **EJEMPLO 8. Supresión de un gen endógeno de resistencia a royas en el lino**

Se preparó una construcción CoP para la supresión del gen endógeno de resistencia a royas, que consistía en

1. Un promotor CaMV 35S; operativamente enlazado con
2. Parte de un gen (n) endógeno de resistencia a royas procedente del lino (con una longitud de aproximadamente 1500 bp), en la orientación sentido; ligada a
3. Una parte similar del gen endógeno de resistencia a royas procedente del lino (con una longitud de aproximadamente 1450 bp), en orientación antisentido, para que se genere una repetición invertida perfecta sin secuencia espaciadora en que cada repetición tiene una longitud de aproximadamente 1450 bp; seguida de
4. Un terminador nos.

Se prepararon construcciones antisentido ordinarias utilizando un fragmento similar, como se describe en el punto 3 anterior, insertado entre un promotor CaMV 35S y un terminador nos.

Las plantas de lino que contenían el gen N (que proporciona resistencia a una cepa de roya del lino) fueron transformadas mediante estas construcciones CoP y antisentido. Si tiene lugar la supresión, las plantas se vuelven susceptibles a la cepa de roya. Si la construcción no tiene efecto alguno, las plantas transformadas permanecen resistentes a la cepa de roya.

#### Resultados

ngc-b sentido/antisentido	3 plantas suprimidas de 7
ngc-b antisentido	0 plantas suprimidas de 12

Aunque el invento ha sido descrito e ilustrado aquí mediante referencias a diversos materiales procedimientos y ejemplos específicos, se entiende que el invento no se limita a los particulares materiales, combinaciones de materiales y procedimientos seleccionados para ese fin. Pueden estar implicadas numerosas variaciones de dichos detalles, que serán apreciadas por los expertos en la técnica.

## REFERENCIAS

- An et al. (1996), *The Plant Cell* 8, 15-30
- Barry et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 4557-4561
- 5 Baulcombe (1996), *Plant Cell* 8, 1833-1844
- Braun y Hemenway (1992), *Plant Cell* 4, 735-744
- Brederode et al. (1995), *Virology* 207, 467-474
- Carr et al. (1992), *Mol. Plant-Microb. Interact.* 5, 397-404
- Christensen y Quail (1996), *Transgenic Research* 5, 213-218
- 10 Croy Plant Molecular Biology Labfax (1993), BIOS Scientific Publications Ltd. (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications (Reino Unido)
- de Carvalho Niebel et al. (1995), *Plant Cell* 7, 347-358
- English et al. (1996), *Plant Cell* 8, 179-188
- Fire et al. (1998), *Nature* 391, 806-811
- 15 Fromm et al. (1990), *Bio/Technology* 8, 833
- Gleave (1992) *Plant Mol. Biol.* 20: 1203-1207
- Goodwin et al. (1996), *Plant Cell* 8, 95-105
- Gordon-Kamm et al. (1990), *The Plant Cell* 2: 603
- Harpster et al. (1988), *Mol. Gen. Genet.* 212, 182-190
- 20 Hobbs et al. (1990), *Plant Mol. Biol.* 15, 851-864
- Hudspeth et al. (1989), *Plant Mol. Biol.* 12, 579-589
- Ingelbrecht et al. (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10.502-10.506
- Jefferson et al. (1987), *EMBO J.* 6, 3901-3907
- Kawchuck et al. (1991), *Molecular plant-microbe interactions* 4, 247-253.
- 25 Keil et al. (1989), *EMBO J.* 8: 1323-1330
- Keller et al. (1988), *EMBO J.* 7: 3625-3633
- Keller et al. (1989), *Genes Devel.* 3: 1639-1646
- Landsman et al. (1988), *Mol. Gen. Genet.* 214, 68-73
- Lindbo y Dougherty (1992 a), *Mol. Plant Micr. Int.* 5, 144-153
- 30 Lindbo y Dougherty (1992 b), *Virology* 189, 725-733
- Lindbo et al. (1993). *Plant Cell* 5, 1749-1759
- Longstaff et al. (1993), *EMBO J.* 12, 379-386
- MacDonald et al. (1991), *Nucl. Acids Res.* 19, 5575-5581
- Metzlaff et al. (1997), *Cell* 88, 845-854
- 35 Meyer et al. (1987), *Nature* 330: 677
- Mueller et al. (1995), *Plant J.* 7, 1001-1003
- Ohta et al. (1990), *Plant Cell. Physiol.* 31, 805-813
- Pang et al. (1996), *Plant J.* 9, 899-909
- Peleman et al. (1989), *Gene* 84: 359-369
- 40 Powell-Abel et al. (1986), *Science* 232, 738-743
- Powell et al. (1990), *Virology* 175, 124-130
- Que et al. (1998), *The Plant Journal* 13, 401-409
- Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- 45 Sanford y Johnston (1985), *J. Theor. Biol.* 113, 395-405
- Schiebel et al. (1993 a), *Journal of Biological Chemistry* 268: 11.851-11.857
- Schiebel et al. (1993 b), *Journal of Biological Chemistry* 268: 11.858-11.867
- Smith et al. (1994), *Plant Cell* 6, 1441-1453
- Stalberg et al., *Plant Molecular Biol.* 23, 671-683
- 50 Stam et al. (1997), *Ann. Botan.* 79, 3-12
- Wagner y Sun (1998), *Nature* 391, 744-745
- Wang et al. (1997) *Journal of Genetics and Breeding* 3
- Wilbur y Lipmann (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 726
- Zheng et al. (1991), *Plant Physiol.* 97, 832-835
- 55 Zuker y Stiegler (1981), *Nucl. Acids Res.* 9,133-148

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Waterhouse, Peter M.  
Wang, Ming-Bo  
Graham, Michael W.  
Commonwealth Scientific and Industrial Research Org.
- <120> Métodos y medios para obtener fenotipos modificados
- 10 <130> echidna
- <140>  
<141>
- 15 <150> US SN 09/056.767  
<151> 1998-03-08
- <150> US SN 09/127735  
<151> 1998-08-03
- 20 <160> 7
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- 25 <210> 1  
<211> 854  
<212> DNA  
<213> Virus Y de la patata
- 30 <220>  
<223> fragmento del ORF de NIa
- <400> 1
- aagctttgaa gattgatttg atgccacata acccactcaa aatttgtgac aaaacaaatg 60**  
**gcattgccaa atttcctgag agagagttcg agctaaggca gactgggcca gctgtagaag 120**  
**tcgacgtgaa ggacatacca gcacaggagg tggaacatga agctaaatcg ctcatgagag 180**  
**gcttgagaga cttcaacca attgcccaaa cagttttag gctgaaagta tctgttgaat 240**  
**atgggacatc agagatgtac ggttttggat ttggagcgtc cataatagcg aaccaccatt 300**  
**tgttcaggag ttataatggt tccatggagg tacgatccat gcacggtaca ttcagggtaa 360**  
**agaatctaca cagtttgagc gttctgcaa ttaaaggtag ggacatcatc ctcattaata 420**  
**tgccaaaaga tttccctgtc tttccacaga aattgcattt ccgagctect acacagaacg 480**  
**aaagaatttg tttagttgga accaactttc aggagaagta tgcatcgtcg atcatcacag 540**  
**aagcaagcac tacttacaat ataccaggca gcacattctg gaagcattgg attgaaacag 600**  
**ataatggaca ctgtggacta ccagtgggtga gcaactgccga tggatgtcta gtcggaattc 660**  
**acagtttggc aaacaatgca cacaccacga actactactc agccttcgat gaagattttg 720**  
**aaagcaagta cctccgaacc aatgagcaca atgaatgggt caagtcttgg atttataatc 780**  
**cagacacagt gttgtggggc ccgttgaaac ttaaagacag cactcctaaa gggttattta 840**  
**aaacaacaaa gctt 854**
- 35

```

<210> 2
<211> 2186
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: región de codificación de la construcción CoP de Gusd

10
<220>
<221> estructura_misc
<222> (..)
<223> región de codificación de Gus deficiente

15
<220>
<221> característica_misc
<222> (..(2186)
<223> antisentido con respecto al extremo 5' de la región de codificación de Gus

<400> 2
atggtacgtc ctgtagaaac cccaaccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttacaa 120
gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt ttaacgatc agttcgccga tgcagatatt 180
cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cggaagtct ttataccgaa aggttgggca 240
ggccagcgtg tcgtgetgcg tttcgatgcg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300
aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccg 360
tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtatc accgtttgtg tgaacaacga actgaactgg 420
cagactatcc cgccgggaat ggtgattacc gacgaaaacg gcaagaaaaa gcagtcttac 480
ttccatgatt tctttaacta tgccggaatc catcgcagcg taatgctcta caccacgccg 540
aacacctggg tggacgatat ctaccgctt cgcgtcggca tccggtcagt ggcagtgaag 600
ggcgaacagt tctgattaa ccacaaaccg ttctacttta ctggctttgg tcgtcatgaa 660
gatgccgact tgcgtggcaa aggattcgat aacgtgctga tgggtgcacga ccacgatta 720
atggactgga ttggggccaa ctccaccgt acctcgcatt acccttacgc tgaagagatg 780
ctcgactggg cagatgaaca tggcatcgtg gtgattgatg aaactgctgc tgtcggcttt 840
aacctctctt taggcattgg tttcgaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcgaa 900
gaggcagtca acggggaac tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg 960
cgtgacaaaa accaccaag cgtggtgatg tggagtattg ccaacgaacc ggatacccg 1020
ccgcaagggt cacgggaata tttcgcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgacccg 1080
acgcgtccga tcacctgct caatgtaatg tttcgcgacg ctcacaccga taccatcagc 1140
gatctctttg atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat 1200
ttggaaacgg cagagaaggt actggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat 1260
cagccgatta tcatcaccga atacggcgtg gatacgttag ccgggctgca ctcaatgtac 1320
accgacatgt ggagtgaaga gtatcagtgt gcatggctgg atatgtatca ccgctcttt 1380
gatcgcgtca gcgccgtcgt cggtaaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg 1440
caaggcatat tgcgcgttgg cggtaacaag aaagggatct tcaactcgcga ccgcaaaccg 1500
aagtcggcgg cttttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaaccg 1560
cagcagggag gcaacaatg aaacagacgc gtggttacag tcttgcgca catgcgtcac 1620

```

20

```

cacggtgata tcgtccaccc aggtgttcgg cgtggtgtag agcatacgct gcgatggatt 1680
ccggcatagt taaagaaatc atggaagtaa gactgctttt tcttgccggtt ttcgtcggta 1740
atcaccatc cggcgggat agtctgccag ttcagttcgt tgttcacaca aacggtgata 1800
cgtacacttt tcccggcaat aacatacggc gtgacatcgg cttcaaatgg cgtatagccg 1860
ccctgatgct ccatcacttc ctgattattg acccacactt tgccgtaatg agtgaccgca 1920
tcgaaacgca gcacgatacg ctggcctgcc caacctttcg gtataaagac ttcgcgctga 1980
taccagacgt tgcccgcata attacgaata tctgcatcgg cgaactgac gttaaaactg 2040
cctggcacag caattgcccg gctttcttgt aacgcgcttt cccaccaacg ctgatcaatt 2100
ccacagtttt cgcgatccag actgaatgcc cacaggcctg cgagtttttt gatttcacgg 2160
gttggggttt ctacaggacg taccat 2186

```

5 <210> 3  
 <211> 208  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: 5'UTR del virus del mosaico del *Sorghum halepense*

```

<400> 3
cgccccgggc ccaacacaac acaacagaac ctacgtcaat tgattttatc aatcgcaaag 60
ccttaciaaag atcttcgcag tcgttcatca acagattcac cgaaccattc ttgttagctc 120
tcgcacagag ataagcagga aaccatggca ggtgagtgga acacagtttg atagtaagag 180
aaaccagagg aagactgcag gtacccgc 208

```

15 <210> 4  
 <211> 1150  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: promotor S4 del virus del trébol subterráneo con el potenciador S7

```

<400> 4
aatctgcagc ggccgcttaa tagtaattat gattaattat gagataagag ttgttattat 60
gcttatgagg aataaagaat gattaatatt gtttaatttt attccgcgaa gcggtgtggt 120
atgtttttgt tggagacatc acgtgactct cacgtgatgt ctccgcgaca ggctggcacg 180
gggcttagta ttaccccgct ccggatcaga gacatttgac taaatattga cttggaataa 240
tagcccttgg attagatgac acgtggacgc tcaggatctg tgatgctagt gaagcgctta 300
agctgaacga atctgacgga agagcggaca tacgcacatg gattatggcc cacatgtcta 360
aagtgtatct ctttacagct atattgatgt gacgtaagat gctttacttc gcttcgaagt 420
aaagtaggaa attgctcgct aagttattct tttctgaaag aaattattta attctaatta 480
aattaaatga gtcgctataa atagtgtcga tgctgcctca catcgtattc ttcttcgcat 540
cgtctgttct ggttttaagc gggatccagg cctcgagata tcgggtacctt gttattatca 600
ataaaagaat ttttattggt attgtgttat ttggtaattt atgcttataa gtaattctat 660
gattaattgt gaattattaa gactaatgag gataataatt gaatttgatt aaattaactc 720

```

25

```

tgcaagcta tatgtcttcc acgtgagagt cacgtgatgt ctccgcgaca ggctggcagc 780
gggcttagta ttaccccgtg ccgggatcag agacatttga ctaaagtgtg acttgggaata 840
atagcccttg gattagatga cacgtggacg ctccaggatct gtgatgctag tgaagcgctt 900
aagctgaacg aatctgacgg aagagcggac aaacgcacat ggactatggc ccaactgcttt 960
attaaagaag tgaatgacag ctgtctttgc ttcaagacga agtaaagaat agtggaaaac 1020
gcgtaaagaa taagcgctact cagtacgctt cgtggcttta tataaatagt gcttcgtctt 1080
attcttcggt gtatcatcaa cgaagaagtt aagctttgct ctgcgcttta atgatcgatg 1140
gccagtcgac 1150

```

- 5 <210> 5  
 <211> 1052  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

- 10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: promotor S4 del virus del trébol subterráneo con el potenciador S4

```

<400> 5
ggatccaggc ctcgagatat cggtagccttg ttattatcaa taaaagaatt tttattgtta 60
ttgtgttatt tggtaattta tgcttataag taattctatg attaattgtg aattattaag 120
actaatgagg ataataattg aatttgatta aattaactct gcgaagctat atgtctttca 180
cgtgagagtc acgtgatgtc tccgcgacag gctggcacgg ggcttagtat taccccgtgc 240
cgggatcaga gacatttgac taaatgttga cttggaataa tagcccttgg attagatgac 300
acgtggacgc tcaggatctg tgatgctagt gaagcgetta agctgaacga atctgacgga 360
agagcggaca aacgcacatg gactatggcc cactgcttta ttaaagaagt gaatgacagc 420
tgtctttgct tcaagacgaa gtaaagaata gtggaaaacg cgtggatcca ggcctcgaga 480
tatcggatcc ttgttattat caataaaaaga atttttattg ttattgtgtt atttggtaat 540
ttatgcttat aagtaattct atgattaatt gtgaattatt aagactaatg aggataataa 600
ttgaatttga ttaaattaac tctgcgaagc tatatgtctt tcacgtgaga gtcacgtgat 660
gtctccgcga caggctggca cygggcttag tattaccccg tgccgggatc agagacattt 720
gactaaatgt tgacttggaa taatagccct tggattagat gacacgtgga cgctcaggat 780
ctgtgatgct agtgaagcgc ttaagctgaa cgaatctgac ggaagagcgg acaaacgcac 840
atggactatg gcccaactgct ttattaaaga agtgaatgac agctgtcttt gcttcaagac 900
gaagtaaaga atagtggaaa acgcgtaaag aataagcgtc ctcagtacgc ttcgtggctt 960
tatataaata gtgcttcgct ttattcttcg ttgtatcatc aacgaagaag ttaagctttg 1020
ttctgcgctt taatgatcga tggccagtcg ac 1052

```

- 15 <210> 6  
 <211> 1583  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

- 20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de codificación de la construcción CoP de desaturasa

- 25 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(480)  
 <223> correspondiente al extremo 5' de la región de codificación de la delta12-desaturasa (fad2), en orientación sentido

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1101)..(1583)

<223> correspondiente al extremo 5' de la región de codificación de la delta12-desaturasa (fad2), en orientación antisentido

5

<400> 6

```

atcattatag cctcatgctt ctactacgtc gccaccaatt acttctctct cctccctcag 60
cctctctctt acttggcttg gccactctat tgggcctgtc aaggctgtgt cctaactggg 120
atctgggtca tagcccacga atgcggtcac cacgcattca gcgactacca atggctggat 180
gacacagttg gtcttatctt ccattccttc ctctctgtcc cttacttctc ctggaagtat 240
agtcacgcgc gtcaccattc caacactgga tccctcgaaa gagatgaagt atttgtccca 300
aagcagaaat cagcaatcaa gtggtacggg aaatacctca acaaccctct tggacgcctc 360
atgatgtaa ccgtccagtt tgcctcggg tggcccttgt acttagcctt taacgtctct 420
ggcagaccgt atgacgggtt cgcttgccat ttcttcccca acgctcccat ctacaatgac 480
cgagaacgcc tccagatata cctctctgat gcggggtatc tagcctctctg ttttggctct 540
taccgttacg ctgctgcaca agggatggcc tcgatgatct gcctctacgg agtaccgctt 600
ctgatagtga atgcgttcct cgtcttgatc acttacttgc agcacactca tccctcgttg 660
cctcactacg attcatcaga gtgggactgg ctccaggggag ctttggctac cgtagacaga 720
gactacggaa tcttgaacaa ggtgttccac aacattacag acacacacgt ggctcatcac 780
ctgttctcga caatgccgca ttataacgca atggaagcta caaaggcgat aaagccaatt 840
ctgggagact attaccagtt cgatggaaca ccgtgggatg tagcgatgta tagggaggca 900
aaggagtgta tctatgtaga accggacagg gaagggtgaca agaaagggtg gtactgggtac 960
aacaataagt tatgagcatg atgggtgaaga aattgtctgac ctttctcttg tctgtttgtc 1020
ttttgttaaa gaagctatgc ttcgttttaa taatcttatt gtccattttg ttgtgttatg 1080
acattttggc tgctcattat gttcagtaac atctaccctc gcaaccctt ctttaccggt 1140
cgcttgggca gtatgccaga cggctctctgc aatttccgat tcatgttccc ggtgggctcc 1200
tgtttgacct gccaatgta gtactacgca ggttctccca acaactccat aaagggcatg 1260
gtgaactaac gactaaagac gaaaccctgt ttatgaagta gagaaagctc cctaggtcac 1320
aaccttacca ctgccgctac tgatatgaag gtcctcttca tccctgctc ctctctctt 1380
accttctatt ctggttgaca cagtaggtcg gtaaccatca gcgacttacg caccactggc 1440
gtaagcacc gatactgggt ctatgggtcaa tctgtgtctg gaactgtccg ggttatctca 1500
ccggttcggt tcattctctc tccgactccc tctctctctc tcattaacca ccgtgcctc 1560
atcttcgtac tccgatatta cta 1583

```

10

<210> 7

<211> 786

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: intrón 2 de la piruvato ortofosfato dicinasa de *Flaveria trinervia*

<400> 7

```

aagcttggta aggaaataat tattttcttt tttcctttta gtataaaata gttaagtgat 60
gttaattagt atgattataa taatatagtt gttataattg tgaaaaaata atttataaat 120
atattgttta cataaacaac atagtaatgt aaaaaaatat gacaagtgat gtgtaagacg 180
aagaagataa aagttgagag taagtatatt atttttaatg aatttgatcg aacatgtaag 240
atgatatact agcattaata tttgttttaa tcataatagt aattctagct ggtttgatga 300
attaaatc aatgataaaa tactatagta aaaataagaa taaataaatt aaaataaat 360
ttttttatga ttaatagttt attatataat taaatatcta taccattact aaatatttta 420
gtttaaaagt taataaatat tttgttagaa attccaatct gcttgtaatt tatcaataaa 480
caaatatta aataacaagc taaagtaaca aataatatca aactaataga aacagtaatc 540
taatgtaaca aacataatc taatgctaata ataacaagc gcaagatcta tcattttata 600
tagtattatt ttcaatcaac attcttatta atttctaaat aataacttgta gttttattaa 660
cttctaaatg gattgactat taattaaatg aattagtcga acatgaataa acaaggtaac 720
atgatagatc atgtcattgt gttatcattg atcttacatt tggattgatt acagttggga 780
aagctt 786

```

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, que se puede expresar en una célula eucariótica, que comprende la operación de introducir en dicha célula un DNA quimérico que comprende las siguientes partes operativamente enlazadas:
- 10 a) un promotor, operativo en dicha célula eucariótica;
- b) una región de DNA que, cuando se transcribe, produce una molécula de RNA con una secuencia de nucleótidos que comprende
- 15 i. una secuencia de nucleótidos sentido de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de entre 75 y 100% con al menos parte de una región de codificación de dicho ácido nucleico de interés; y
- ii. una secuencia de nucleótidos antisentido que incluye al menos 10 nucleótidos consecutivos, que tiene una identidad de secuencia de entre 75% y 100% con el complemento de dichos al menos 10 nucleótidos consecutivos de dicha secuencia de nucleótidos sentido;
- 20 en que el RNA es capaz de formar una estructura de RNA artificial en horquilla con un tallo de RNA de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con secuencias de nucleótidos sentido y antisentido de modo que al menos dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido se apareen por bases con dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido;
- 25 en que dicho ácido nucleico de interés es un gen integrado en el genoma de dicha célula eucariótica, y en que dicho método no es un método de tratamiento del organismo humano o animal por cirugía o terapia, ni un método diagnóstico llevado a la práctica en el organismo humano o animal.
- 30 2. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el DNA quimérico comprende además una región de DNA implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación.
- 35 3. Un método para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, que se puede expresar en una célula eucariótica, que comprende la operación de introducir en dicha célula una molécula de RNA quimérica que comprende al menos una región de RNA con una secuencia de nucleótidos que comprende
- 40 i. una secuencia de nucleótidos sentido de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de entre 75 y 100% con al menos parte de una región de codificación del ácido nucleico de interés; y
- ii. una secuencia de nucleótidos antisentido que incluye al menos 10 nucleótidos consecutivos, que tiene una identidad de secuencia de entre 75% y 100% con el complemento de dichos al menos 10 nucleótidos consecutivos de dicha secuencia de nucleótidos sentido;
- 45 en que dicha región de RNA es capaz de formar una estructura de RNA artificial en horquilla con un tallo de RNA de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con secuencias de nucleótidos sentido y antisentido de modo que al menos dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido se apareen por bases con dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido; y
- 50 en que dicho ácido nucleico de interés es un gen integrado en el genoma de dicha célula eucariótica, y en que dicho método no es un método de tratamiento del organismo humano o animal por cirugía o terapia, ni un método diagnóstico llevado a la práctica en el organismo humano o animal.
- 55 4. El método de la Reivindicación 1 ó 2, en que dicha molécula de RNA comprende además una secuencia de nucleótidos espaciadora situada entre dichas secuencias de nucleótidos sentido y antisentido.
- 60 5. El método de la Reivindicación 1 ó 2, en que dicha secuencia de nucleótidos sentido tiene una longitud total de al menos 15 nucleótidos.
6. El método de la Reivindicación 1 ó 2, en que la secuencia de nucleótidos sentido total tiene una identidad de secuencia de al menos 85% con la parte correspondiente del ácido nucleico de interés.
- 65 7. El método de la Reivindicación 6, en que la secuencia de nucleótidos sentido incluye una secuencia de 20 nucleótidos con una identidad de secuencia del 100% con la parte correspondiente del ácido nucleico de interés.

8. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 5 a 7, en que dicha secuencia de nucleótidos antisentido tiene una longitud total que corresponde a la de la secuencia de nucleótidos sentido.
- 5 9. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 5 a 7, en que la longitud de la secuencia de nucleótidos antisentido difiere de la de la secuencia de nucleótidos sentido en aproximadamente un 10%.
10. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, en que la secuencia de nucleótidos antisentido tiene una identidad de secuencia de al menos 85% con el complemento de la secuencia de nucleótidos sentido.
- 10 11. El método de la Reivindicación 10, en que la secuencia de nucleótidos antisentido incluye una secuencia de 20 nucleótidos con una identidad de secuencia del 100% con el complemento de la secuencia de nucleótidos sentido.
12. El método de la Reivindicación 1 ó 2, en que dicha secuencia de nucleótidos sentido tiene una longitud total de al menos 50 nucleótidos.
- 15 13. El método de la Reivindicación 1, en que la molécula de RNA consiste en el RNA en horquilla.
14. El método de la Reivindicación 1 ó 3, en que dicho gen es un gen endógeno.
- 20 15. El método de la Reivindicación 1 ó 3, en que dicho gen es un transgén extraño.
16. El método de la Reivindicación 1, en que dicho DNA quimérico se integra establemente en el genoma del DNA.
- 25 17. El método de la Reivindicación 1 ó 2, en que dicho ácido nucleico de interés está comprendido en el genoma de un virus infectivo.
18. El método de la Reivindicación 17, en que dicho virus infectivo es un virus de RNA.
- 30 19. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, 2 ó 3, en que dicha célula eucariótica es una célula vegetal.
20. El método de la Reivindicación 19, en que dicha célula vegetal está comprendida dentro una planta.
21. Un método de acuerdo con la Reivindicación 20, en que la planta es una planta agrícola o una planta comestible.
- 35 22. Un método de acuerdo con la Reivindicación 21, en que la planta es maíz, arroz, trigo, cebada, caña de azúcar, algodón, colza de semilla oleaginosa, soja, achicoria, vegetales de *Brassica*, lechuga, tomate, tabaco, patata o remolacha azucarera.
- 40 23. Un método de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 22, en que la expresión fenotípica reducida se usa para obtener resistencia al desprendimiento de partes vegetales, para obtener patrones modificados de los colores de las flores, para obtener plantas resistentes a nematodos, para retrasar la maduración de los frutos, para obtener esterilidad masculina, para reducir la presencia de metabolitos secundarios en plantas, para modificar mediante ingeniería metabólica el perfil de metabolitos sintetizados en una célula vegetal, para retrasar el envejecimiento, para alterar la lignificación, para alterar la calidad de las fibras en el algodón, para aumentar la resistencia a las machacaduras en las patatas al reducir la polifenol oxidasa, para obtener resistencia a virus o para obtener resistencia a enfermedades o plagas.
- 45 24. Un método para identificar un fenotipo asociado con la expresión de un ácido nucleico de interés en una célula eucariótica, siendo dicho ácido nucleico de interés un gen integrado en el genoma de dicha célula eucariótica, método que comprende
- 50 a. seleccionar una secuencia diana de al menos 10 nucleótidos consecutivos en dicha secuencia de nucleótidos de interés;
- 55 b. diseñar una secuencia de nucleótidos sentido que corresponda a la longitud de la secuencia diana seleccionada y que tenga una identidad de secuencia de al menos 75% a 100% con dicha secuencia diana seleccionada;
- c. diseñar una secuencia de nucleótidos antisentido que
- 60 i) tenga una identidad de secuencia de al menos 75% a 100% con el complemento de dichos al menos 10 nucleótidos consecutivos de dicha secuencia de nucleótidos sentido; y
- ii) comprenda un tramo de al menos aproximadamente 10 nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia del 100% con respecto al complemento de una parte de dicha secuencia de nucleótidos sentido;
- 65 d. introducir una molécula de RNA que comprende tanto dicha secuencia de nucleótidos sentido como dicha se-

- 5 cuencia de nucleótidos antisentido en una célula huésped eucariótica adecuada que comprende el ácido nucleico que incluye la secuencia de nucleótidos con el fenotipo hasta ahora no identificado, en que dicho RNA es capaz de formar una estructura de RNA artificial en horquilla con un tallo de RNA de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido de modo que al menos dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido se apareen por bases con dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido; y
- e. observar el fenotipo mediante un método adecuado.
- 10 25. El método de acuerdo con la Reivindicación 24, en que la célula eucariótica es una célula vegetal.
26. El método de acuerdo con la Reivindicación 24 ó 25, en que la secuencia diana comprende al menos parte de un marco de lectura abierto.
- 15 27. El método de acuerdo con la Reivindicación 24 ó 25, en que la secuencia de nucleótidos antisentido comprende un tramo de aproximadamente 20 nucleótidos consecutivos con una identidad de secuencia del 100% con respecto al complemento de una parte de dicha secuencia de nucleótidos sentido.
- 20 28. Una célula eucariótica que comprende un ácido nucleico de interés, que se puede expresar fenotípicamente, que comprende además una molécula de DNA quimérica que comprende las siguientes partes operativamente enlazadas:
- a) un promotor, operativo en dicha célula eucariótica;
- 25 b) una región de DNA que, cuando se transcribe, produce una molécula de RNA con al menos una región de RNA con una secuencia de nucleótidos que comprende
- i) una secuencia de nucleótidos sentido de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de entre 75 y 100% con al menos parte de una región de codificación del ácido nucleico de interés; y
- 30 ii) una secuencia de nucleótidos antisentido que incluye al menos 10 nucleótidos consecutivos, que tiene una identidad de secuencia de entre 75% y 100% con el complemento de dichos al menos 10 nucleótidos consecutivos de dicha secuencia de nucleótidos sentido;
- 35 en que el RNA es capaz de formar una estructura de RNA artificial en horquilla con un tallo de RNA de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido; y
- 40 en que dicho ácido nucleico de interés es un gen integrado en el genoma de dicha célula eucariótica.
29. Una célula de acuerdo con la Reivindicación 28, en que la molécula de DNA quimérica comprende además una región de DNA implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación.
- 45 30. Una célula eucariótica que comprende un ácido nucleico de interés, que se puede expresar fenotípicamente, que comprende además una molécula de RNA quimérica que comprende al menos una región de RNA con una secuencia de nucleótidos que comprende
- i) una secuencia de nucleótidos sentido de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de entre 75 y 100% con al menos parte de una región de codificación del ácido nucleico de interés; y
- 50 ii) una secuencia de nucleótidos antisentido que incluye al menos 10 nucleótidos consecutivos, que tiene una identidad de secuencia de entre 75% y 100% con el complemento de dichos al menos 10 nucleótidos consecutivos de dicha secuencia de nucleótidos sentido;
- 55 en que dicho RNA es capaz de formar un RNA artificial en horquilla con una región de RNA de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido de modo que al menos dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido se apareen por bases con dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido; y
- 60 en que dicho ácido nucleico de interés es un gen integrado en el genoma de dicha célula eucariótica.
31. La célula eucariótica de la Reivindicación 29 ó 30, que es una célula vegetal.
32. Una planta que comprende la célula vegetal de la Reivindicación 31.
- 65 33. Una molécula de RNA quimérica que comprende al menos una región de RNA con una secuencia de nucleótidos

que comprende

- i. una secuencia de nucleótidos sentido de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de entre 75 y 100% con al menos parte de una región de codificación de un ácido nucleico de interés; siendo dicho ácido nucleico de interés un gen incorporado en el genoma de una célula eucariótica; y
- ii. una secuencia de nucleótidos antisentido que incluye al menos 10 nucleótidos consecutivos, que tiene una identidad de secuencia de entre 75% y 100% con el complemento de dichos al menos 10 nucleótidos consecutivos de dicha secuencia de nucleótidos sentido;

en que el RNA es capaz de formar una estructura de RNA artificial en horquilla con un tallo de RNA de doble cadena por apareamiento de bases entre las regiones con las secuencias de nucleótidos sentido y antisentido de modo que al menos dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido se apareen por bases con dichos 10 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido.

34. La célula de acuerdo con la Reivindicación 28, o la molécula de RNA quimérica de acuerdo con la Reivindicación 33, en que la molécula de RNA comprende además una secuencia de nucleótidos espaciadora situada entre dichas secuencias de nucleótidos sentido y antisentido.

35. La célula de acuerdo con la Reivindicación 28 o la molécula de RNA quimérica de acuerdo con la Reivindicación 33, en que dicha secuencia de nucleótidos sentido tiene una longitud total de al menos 15 nucleótidos, preferiblemente al menos 50 nucleótidos.

36. La célula de acuerdo con la Reivindicación 28, o la molécula de RNA quimérica de acuerdo con la Reivindicación 33, en que la secuencia de nucleótidos sentido total tiene una identidad de secuencia de al menos 85% con la parte correspondiente del ácido nucleico de interés.

37. La célula o la molécula de RNA quimérica de acuerdo con la Reivindicación 36, en que la secuencia de nucleótidos sentido incluye una secuencia de aproximadamente 20 nucleótidos con una identidad de secuencia del 100% con respecto a la parte correspondiente del ácido nucleico de interés.

38. La célula o la molécula de RNA quimérica de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 35 a 37, en que dicha secuencia de nucleótidos antisentido tiene una longitud total que corresponde a la de la secuencia de nucleótidos sentido.

39. La célula o la molécula de RNA quimérica de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 35 a 37, en que la longitud de la secuencia de nucleótidos antisentido difiere de la de la secuencia de nucleótidos sentido en aproximadamente un 10%.

40. La célula de acuerdo con la Reivindicación 28, o la molécula de RNA quimérica de acuerdo con la Reivindicación 33, en que la secuencia de nucleótidos antisentido tiene una identidad de secuencia de al menos 85% con respecto al complemento de la secuencia de nucleótidos sentido.

41. La célula o la molécula de RNA quimérica de acuerdo con la Reivindicación 40, en que la secuencia de nucleótidos antisentido incluye una secuencia de 20 nucleótidos con una identidad de secuencia del 100% con respecto al complemento de la secuencia de nucleótidos sentido.

42. La célula de acuerdo con la Reivindicación 28, o la molécula de RNA quimérica de acuerdo con la Reivindicación 33, para uso en la reducción de una infección vírica o en la obtención de resistencia a una enfermedad.

43. Un método para modificar el perfil de ácidos grasos en el aceite de una planta, método que comprende la operación de introducir un DNA quimérico en las células de dicha planta, DNA quimérico que comprende las siguientes partes operativamente enlazadas:

- a) un promotor expresable en plantas; y
- b) una región de DNA que, cuando se transcribe, produce una molécula de RNA que comprende una región de RNA capaz de formar una estructura artificial de tallo-bucle, en que una de las secuencias de RNA hibridantes de la estructura de tallo-bucle comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de al menos 75% con al menos parte de la secuencia de nucleótidos de un marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta 12$  desaturasa, y en que la segunda de dichas secuencias de RNA hibridantes comprende una secuencia de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de al menos 75% con al menos parte del complemento de al menos parte de la secuencia de nucleótidos de dicho marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta 12$  desaturasa.

44. Un método de acuerdo con la Reivindicación 43, en que el DNA quimérico comprende además una región de

DNA implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación.

45. El método de la reivindicación 43 ó 44, en que dicha modificación del perfil de ácidos grasos comprende aumentar el contenido de ácido oleico.

5 46. Una planta que produce aceite con un perfil de ácidos grasos modificado, planta que comprende un DNA quimérico, DNA quimérico que comprende las siguientes partes operativamente enlazadas:

10 a) un promotor expresable en plantas; y

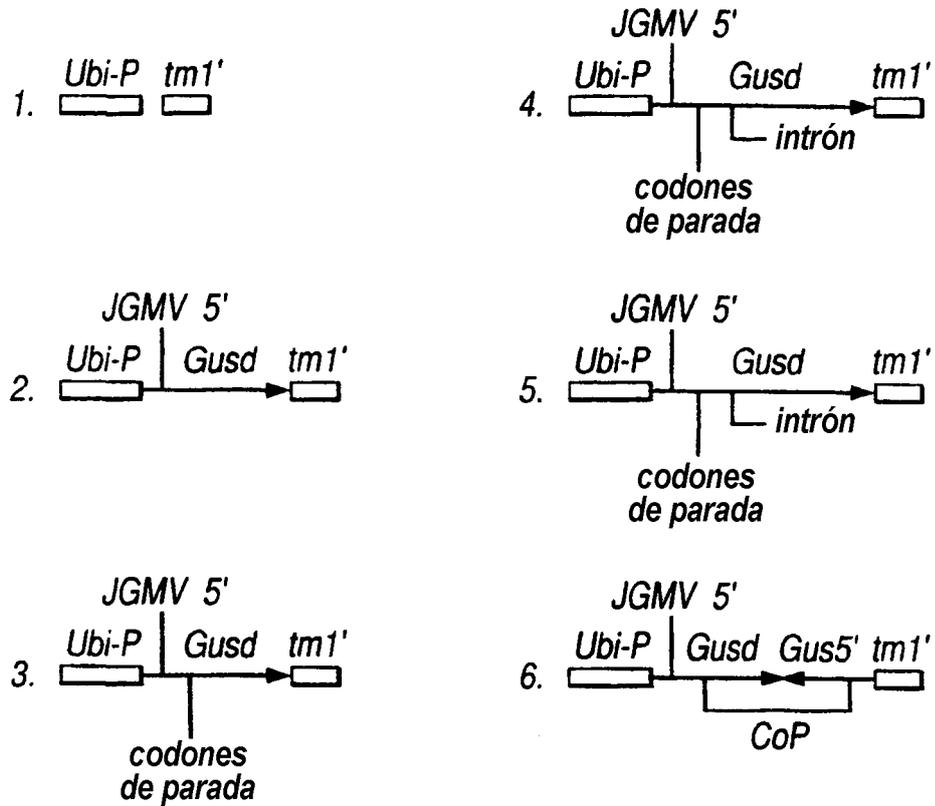
15 b) una región de DNA que, cuando se transcribe, produce una molécula de RNA que comprende una región de RNA capaz de formar una estructura artificial de tallo-bucle, en que una de las secuencias de RNA hibridantes de la estructura de tallo-bucle comprende una secuencia de nucleótidos de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de al menos 75% con al menos parte de la secuencia de nucleótidos de un marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta 12$  desaturasa, y en que la segunda de dichas secuencias de RNA hibridantes comprende una secuencia de al menos 10 nucleótidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de al menos 75% con al menos parte del complemento de al menos parte de la secuencia de nucleótidos de dicho marco de lectura abierto que codifica la  $\Delta 12$  desaturasa.

20 47. Una planta de acuerdo con la Reivindicación 46, en que el DNA quimérico comprende además una región de DNA implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación.

25 48. El método de la Reivindicación 43 o la planta de la Reivindicación 46, en que dicha región de DNA comprende la secuencia de nucleótidos de ID. SEC. nº 6.

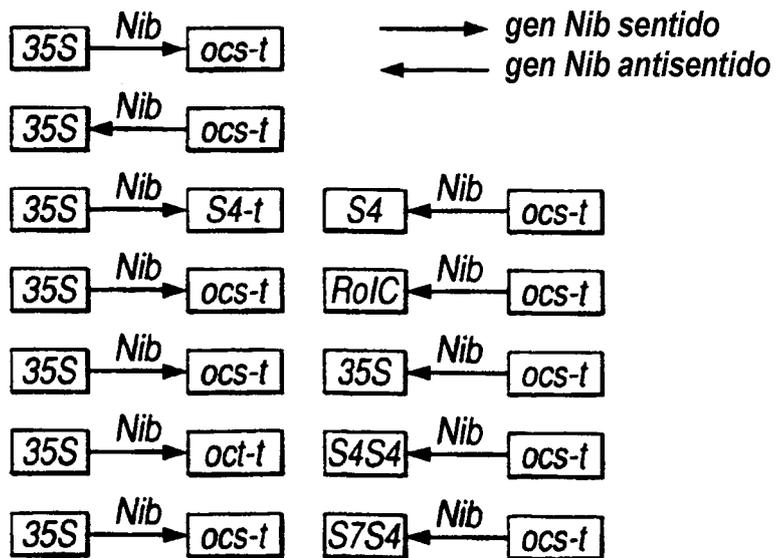
49. El método de la Reivindicación 43 o la planta de la Reivindicación 46, en que dicho promotor expresable en plantas es un promotor específico de semillas.

30 50. El método de la Reivindicación 43 o la planta de la Reivindicación 46, en que dicha planta es colza de semilla oleaginosa.



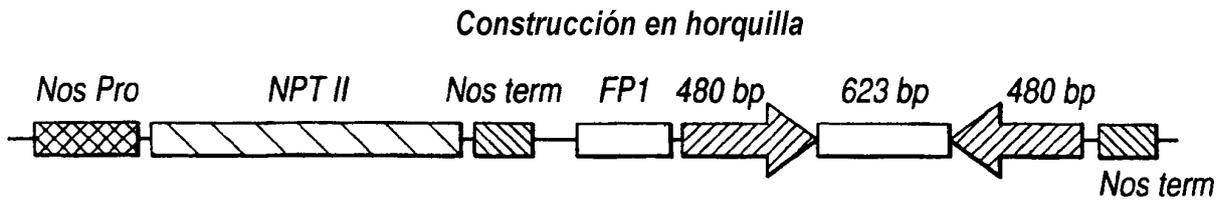
Representación esquemática de los genes quiméricos usados en el Ejemplo 1

**Fig. 1A**

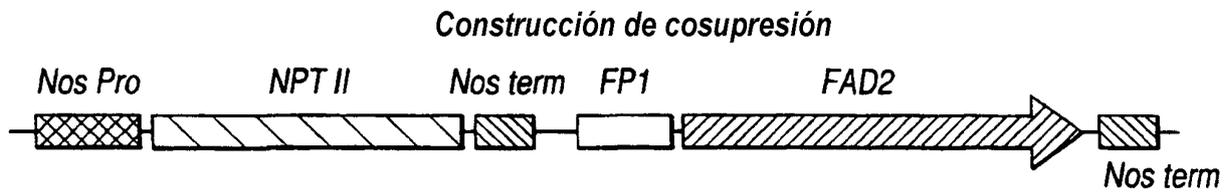


Representación esquemática de los genes quiméricos usados en los Ejemplos 2 y 4

**Fig. 1B**



*Fig.2A*



*Fig.2B*