

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 521**

51 Int. Cl.:
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04030122 .8**
96 Fecha de presentación: **25.05.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1516931**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.03.2005**

54 Título: **REGULACIÓN MEDIADA POR ARNBC DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN PLANTAS.**

30 Prioridad:
26.05.1998 US 84942

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.02.2012

73 Titular/es:
**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG
SCHWARZWALDALLEE 215
4058 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**Heifetz, Peter Bernard;
Patton, David Andrew;
Levin, Joshua;
Que, Qiudeng;
De Framond, Annick Jeanne;
Dunn, Martha M. y
Chen, Jeng Shong**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 374 521 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

Regulación mediada por ARNbc de la expresión génica en plantas

La presente invención se refiere a procedimientos para alterar la expresión de genes en plantas, en particular usando fragmentos de ARN sentido y antisentido de dichos genes y a plantas con expresión génica alterada obtenidas usando los procedimientos de la presente invención.

Los desarrollos en las técnicas de biología molecular y transformación de plantas han permitido la producción de plantas transgénicas con diversos rasgos deseables, tales como, por ejemplo, resistencia a insectos y patógenos fúngicos o microbianos, tolerancia a herbicidas o rasgos de valor añadido. Estos rasgos deseables se obtienen principalmente mediante sobreexpresión de un transgén en la planta. Sin embargo, en algunos casos, también es deseable modificar plantas de modo que la expresión de un gen particular se altere para crear plantas con fenotipos deseables o propiedades de interés comercial. Los procedimientos actuales para alterar la expresión de un gen habitualmente se basan en técnicas de supresión sentido o antisentido. Por ejemplo, la supresión sentido de un gen de chalcona sintasa en *Petunia* da como resultado flores con pigmentación alterada y la supresión antisentido de un gen de poligalacturonidasa en tomate conduce a retardo en la maduración de la fruta. Desafortunadamente, estos procedimientos son con frecuencia variables e impredecibles en su capacidad para alterar la expresión génica y en muchos casos no se consigue una interrupción completa de actividad génica particular. Otros procedimientos para alterar la expresión génica incluyen el uso de ribonucleótidos catalíticos o ribozimas, que puede ser técnicamente difícil o interrupción génica homóloga, que, aunque es la más deseable genéticamente, desafortunadamente no es suficientemente eficaz con las técnicas disponibles en la actualidad para usarse rutinariamente para tales fines.

Existe por lo tanto una necesidad largamente sentida pero no satisfecha de nuevos procedimientos que permitan alterar de forma eficaz y predecible la expresión de un gen en células vegetales para obtener plantas con propiedades mejoradas y comercialmente importantes.

El documento EP0458367A1 describe estudios de prueba de concepto de supresión génica mediada por antisentido. Específicamente, el gen *aroA* de la bacteria *Salmonella typhimurium* se usó como el gen exógeno diana expresado en plantas. La reducción de la expresión del gen exógeno diana *aroA* se demostró después de la expresión de la secuencia diana como un ARN diana sentido positivo (ARN sentido), que se neutralizó después por el ARN sentido negativo correspondiente (secuencia de *aroA* antisentido).

Fire, A. y col (Nature, 1998, Vol. 391, pág. 806-811) describe expresión reducida de un gen diana en gusanos nematodos después de microinyección de un ARN bicatenario correspondiente al gen diana. La especie de ARN se preparó *in vitro* antes de la inyección en el gusano.

Wassenegger, M. y Pelissier, T. (Plant Molecular Biology, 1998, Vol. 37, pág. 349-362) describe diversas teorías de supresión génica en plantas. En particular se propone un mecanismo unificado que explica las observaciones de supresión génica anteriores. En el mecanismo unificado, una ARN polimerasa dependiente de ARN crea especies de ARN antisentido cortas de un molde de ARN sentido. Estas especies de ARN antisentido median después la supresión del gen diana.

Los documentos tanto WO 99/32619 como WO 99/49029 son relevantes para los fines de novedad solamente según el artículo 54 (3) de EPC.

El documento WO 99/32619 describe expresión reducida de un gen diana usando ARN bicatenario diseñado específicamente correspondiente al gen diana.

El documento WO 99/49029 describe un procedimiento para modular la expresión de un gen diana usando una o más moléculas de ácido nucleico dispersadas o moléculas de ácido nucleico ajenas que se introducen en una célula, tejido u órgano. Las moléculas introducidas comprenden múltiples copias de una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de dicho gen diana o una región del mismo durante un tiempo y en condiciones suficientes para que la traducción del producto de ARNm de dicho gen diana se modifique. Como alternativa, las múltiples copias son complementarias en secuencia a la secuencia de nucleótidos del gen diana. Los procedimientos están sujetos a la condición de que la transcripción de dicho producto de ARNm no se reprima o reduzca de forma exclusiva.

La presente invención se refiere a la producción de plantas con propiedades y rasgos mejorados usando técnicas moleculares y transformación genética. En particular, la invención se refiere a procedimientos para alterar la expresión de un gen en una célula vegetal usando fragmentos de ARN sentido y antisentido del gen. Resulta importante que dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido son capaces de formar una molécula de ARN bicatenaria. La invención también se refiere a células vegetales obtenidas usando tales procedimientos, a plantas derivadas de tales células, a la descendencia de tales plantas y a semillas derivadas de tales plantas. En tales células vegetales o plantas, la alteración de la expresión génica de un gen particular es más eficaz, selectiva y más predecible que la alteración de la expresión génica de un gen particular obtenido usando procedimientos actuales conocidos en la técnica.

La invención se refiere por lo tanto a:

5 Un procedimiento que comprende introducir en una célula vegetal un fragmento de ARN sentido de un gen diana y un fragmento de ARN antisentido de dicho gen diana, en el que dicho fragmento de ARN sentido y dicho fragmento de ARN antisentido son capaces de formar una molécula de ARN bicatenaria, en la que la expresión de dicho gen diana en dicha célula está alterada.

10 En particular, la invención proporciona un procedimiento para reducir la expresión de un gen diana en una célula vegetal que comprende introducir en la célula vegetal una primera secuencia de ADN capaz de expresar un fragmento de ARN sentido de un gen diana y una segunda secuencia de ADN capaz de expresar un fragmento de ARN antisentido de dicho gen diana, en el que dichas primera y segunda secuencias de ADN están comprendidas en una molécula de ADN, en el que dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido son capaces de formar una molécula de ARN bicatenaria, en el que dicha molécula de ADN comprende además una secuencia de ADN que comprende un engarce que comprende señales de procesamiento de intrones entre dicha primera y segunda secuencias de ADN, en el que la expresión de dicho gen diana en dicha célula vegetal se reduce cuando dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido se expresan de dichas primera y segunda secuencias de ADN y dichos fragmentos de ARN forman una molécula de ARN bicatenaria.

En consecuencia la invención se refiere a:

20 Un procedimiento que comprende introducir en una célula vegetal una primera secuencia de ADN capaz de expresar en dicha célula un fragmento de ARN sentido de un gen diana y una segunda secuencia de ADN capaz de expresar en dicha célula un fragmento de ARN antisentido de dicho gen diana, en el que dicho fragmento de ARN sentido y dicho fragmento de ARN antisentido son capaces de formar una molécula de ARN bicatenaria; en el que la expresión de dicho gen diana en dicha célula vegetal está alterada. Las secuencias de ADN están comprendidas en una molécula de ADN que está integrada de forma estable preferentemente en el genoma de la célula vegetal. La molécula de ADN comprende adicionalmente preferentemente un promotor ligado operativamente a dicha primera o dicha segunda secuencia de ADN. Como se ha observado anteriormente, la primera secuencia de ADN y la segunda secuencia de ADN están comprendidas en una molécula de ADN. La primera secuencia de ADN y la segunda secuencia de ADN están comprendidas preferentemente en la misma cadena de ADN de dicha molécula de ADN y, preferentemente, el fragmento de ARN sentido y el fragmento de ARN antisentido están comprendidos en una molécula de ARN. La molécula de ARN es capaz de plegarse de modo que dichos fragmentos de ARN comprendidos en la misma forman una región bicatenaria. En otra realización preferida, el fragmento de ARN sentido y el fragmento de ARN antisentido están comprendidos en o se expresan como dos moléculas de ARN. En este caso, la primera secuencia de ADN y la segunda secuencia de ADN están preferentemente ligadas operativamente a un promotor bidireccional o, como alternativa, la primera secuencia de ADN está ligada operativamente a un primer promotor y la segunda secuencia de ADN está ligada operativamente a un segundo promotor, siendo el primer promotor y el segundo promotor el mismo promotor o promotores diferentes. En otra realización preferida, la primera secuencia de ADN y la segunda secuencia de ADN están comprendidas en hebras complementarias de dicha molécula de ADN.

40 En otra realización preferida más, la molécula de ADN comprende adicionalmente un primer promotor ligado operativamente a dicha primera secuencia de ADN y un segundo promotor ligado operativamente a dicha segunda secuencia de ADN, comprendiendo el primer promotor y el segundo promotor el mismo promotor o comprendiendo promotores diferentes.

45 En otra realización preferida, el gen diana es un gen nativo de dicha célula vegetal, preferentemente un gen esencial de dicha célula vegetal. En otra realización preferida más, un promotor en la molécula de ADN comprende el promotor nativo de dicho gen diana nativo. En una realización preferida adicional, el promotor es un promotor heterólogo, por ejemplo un promotor específico de tejido, un promotor regulado por el desarrollo, un promotor constitutivo o un promotor inducible. Opcionalmente, el promotor es un promotor divergente capaz de iniciar la transcripción de secuencias de ADN en cada lado del promotor. En otra realización preferida, el gen es un gen heterólogo en dicha célula vegetal, preferentemente integrado de forma estable en el genoma de dicha célula vegetal o, como alternativa, presente en dicha célula vegetal como una molécula extracromosómica.

50 La secuencia de ADN comprende adicionalmente un engarce entre las secuencias de ADN que codifican dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido. El engarce comprende secuencias reguladoras, comprendiendo dichas secuencias reguladoras señales de procesamiento de intrones.

La invención también proporciona adicionalmente:

55 Una célula vegetal que comprende los fragmentos de ARN sentido y antisentido de la presente invención, que se introducen en la célula vegetal mediante expresión de dichas primera y segunda secuencias de ADN, como se ha descrito anteriormente; estando la expresión de dicho gen diana en dicha célula vegetal alterada por dichos fragmentos de ARN, una planta y la descendencia de la misma derivan de la célula vegetal y derivan semillas de la planta.

La invención también proporciona adicionalmente:

Una célula vegetal obtenida por un procedimiento de la presente invención.

En particular, la invención proporciona una célula vegetal que comprende una primera secuencia de ADN capaz de expresar un fragmento de ARN sentido de un gen diana y una segunda secuencia de ADN capaz de expresar un fragmento de ARN antisentido de dicho gen diana, siendo fragmentos de ARN sentido y antisentido capaces de formar una molécula de ARN bicatenaria, estando dichas primera y segunda secuencias de ADN comprendidas en una molécula de ADN que está integrada de forma estable en el genoma de dicha célula vegetal, comprendiendo dicha célula vegetal adicionalmente una secuencia de ADN que comprende un engarce que comprende señales de procesamiento de intrones entre dicha primera secuencia de ADN y dicha segunda secuencia de ADN, reduciéndose la expresión de dicho gen diana en dicha célula vegetal cuando se expresan dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido de dichas primera y segundas secuencias de ADN y formando dichos fragmentos de ARN una molécula de ARN bicatenaria.

La invención también proporciona una planta que comprende la célula vegetal anteriormente mencionada y la invención también proporciona la descendencia de la planta anteriormente mencionada comprendiendo dicha descendencia la célula vegetal anteriormente mencionada.

Una molécula de "ARN bicatenaria" (ARNbc) comprende un fragmento de ARN sentido de un gen diana y un fragmento de ARN antisentido del mismo gen diana, que comprenden ambas secuencias de nucleótidos complementarias entre sí, permitiendo de este modo que los fragmentos de ARN sentido y antisentido se emparejen y formen una molécula de ARN bicatenaria.

"Complementarias" se refiere a dos secuencias de nucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos antiparalelas capaces de emparejarse entre sí tras la formación de enlaces de hidrógeno entre los restos de bases complementarias en las secuencias de nucleótidos antiparalelas.

"Antiparalelo" se refiere en el presente documento a dos secuencias de nucleótidos emparejadas a través de enlaces de hidrógeno entre restos de bases complementarias con enlaces fosfodiéster avanzando en la dirección 5'-3' en una secuencia de nucleótidos y en la dirección 3'-5' en la otra secuencia de nucleótidos.

Un "gen diana" es cualquier gen en una célula vegetal. Por ejemplo, un gen diana es un gen de función conocida o es un gen cuya función se desconoce, pero cuya secuencia de nucleótidos total o parcial se conoce. Como alternativa, la función de un gen diana y su secuencia de nucleótidos son ambas desconocidas. Un gen diana es un gen nativo de la célula vegetal o es un gen heterólogo que se había introducido previamente en la célula vegetal o una célula parental de dicha célula vegetal, por ejemplo por transformación genética. Un gen diana heterólogo se integra de forma estable en el genoma de la célula vegetal o está presente en la célula vegetal como una molécula extracromosómica, por ejemplo, como una molécula extracromosómica de replicación autónoma.

Un gen "nativo" se refiere a un gen que está presente en el genoma de la célula vegetal no transformada.

Un gen "esencial" es un gen que codifica una proteína tal como por ejemplo una enzima biosintética, receptor, proteína de transducción de señal, producto génico estructural o proteína de transporte que es esencial para el crecimiento o supervivencia de la planta.

"Alterar" la expresión de un gen diana en una célula vegetal significa que el nivel de expresión del gen diana en una célula vegetal después de aplicar un procedimiento de la presente invención es diferente de su expresión en la célula antes de aplicar el procedimiento. Alterar la expresión génica significa preferentemente que la expresión del gen diana en la planta se reduce, preferentemente se reduce fuertemente, más preferentemente la expresión del gen no es detectable. La alteración de la expresión de un gen esencial puede dar como resultado un fenotipo mutante knockout en células vegetales o plantas derivadas de las mismas.

"Aislado" es, en el contexto de la presente invención, una molécula de ácido nucleico aislada que, por la mano del hombre, existe separada de su ambiente nativo y no es por lo tanto un producto de la naturaleza. Una molécula de ácido nucleico aislada puede existir en una forma purificada o pueden existir en un ambiente no nativo tal como, por ejemplo, una célula huésped transgénica.

"Casete de expresión" como se usa en el presente documento significa una secuencia de ADN capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula huésped apropiada, que comprende un promotor ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés que está ligada operativamente a señales de terminación. También comprende típicamente secuencias requeridas para la traducción apropiada de la secuencia de nucleótidos. La región codificante habitualmente codifica una proteína de interés pero también puede codificar un ARN funcional de interés, por ejemplo, ARN antisentido o un ARN no traducido, en la dirección sentido o antisentido. El casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser uno que es de origen natural pero se ha obtenido en una forma recombinante útil para expresión heteróloga. Típicamente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al huésped, es decir, la secuencia de ADN particular del casete de expresión no aparece de forma natural en la célula huésped y debe haberse introducido en la célula huésped o un ancestro de la célula huésped por un

acontecimiento de transformación. La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la transcripción solamente cuando la célula huésped se expone a algún estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, tal como una planta, el promotor también puede ser específico para un tejido u órgano o etapa de desarrollo particular.

5 “Heterólogo” como se usa en el presente documento significa “de diferente origen natural” o representa un estado no natural. Por ejemplo, si una célula huésped se transforma con una secuencia de ácido nucleico derivada de otro organismo, particularmente de otra especie, esa secuencia de ácido nucleico es heteróloga con respecto a esa célula huésped y también con respecto a descendientes de la célula huésped que portan la secuencia de ácido nucleico. De forma similar, heterólogo se refiere a una secuencia de nucleótidos derivada de e insertada en el mismo tipo celular original natural, pero que está presente en un estado no natural, por ejemplo, un número de copias diferente o bajo el control de diferentes elementos reguladores.

10 En su sentido más amplio, la expresión “sustancialmente similar”, cuando se usa en el presente documento con respecto a una secuencia de nucleótidos, significa una secuencia de nucleótidos que corresponde a una secuencia de nucleótidos de referencia, codificando la secuencia correspondiente un polipéptido que tiene sustancialmente la misma estructura y función que el polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de referencia, por ejemplo, cuando sólo se producen cambios en aminoácidos que no afectan a la función polipeptídica. Resulta deseable que la secuencia de nucleótidos sustancialmente similar codifique el polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de referencia. El porcentaje de identidad entre la secuencia de nucleótidos sustancialmente similar y la secuencia de nucleótidos de referencia (número de bases complementarias en la secuencia complementaria dividido por el número total de bases en la secuencia complementaria) de forma deseable es al menos 80 %, más deseable 85 %, preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, aún más preferentemente al menos 99 %.

15 “Elementos reguladores” se refiere a secuencias implicadas en conferir la expresión de una secuencia de nucleótidos. Los elementos reguladores comprenden un promotor ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés y señales de terminación. También abarcan típicamente secuencias requeridas para la traducción apropiada de la secuencia de nucleótidos.

20 Una “planta” se refiere a cualquier planta o parte de una planta en cualquier etapa del desarrollo. En ella se incluyen también esquejes, cultivos celulares o tisulares y semillas. Como se usa junto con la presente invención, la expresión “tejido vegetal” incluye, pero sin limitación, plantas completas, células vegetales, órganos vegetales, semillas vegetales, protoplastos, callos, cultivos celulares y cualquier grupo de células vegetales organizado en unidades estructurales y/o funcionales.

25 La presente invención se refiere a procedimientos para regular la expresión génica en células vegetales. Los procedimientos disponibles habitualmente para regular la expresión de un gen en células vegetales carecen de predictabilidad y muestran variabilidad dependiendo de qué gen va a regularse. El presente procedimiento alivia estos problemas y proporciona regulación reproducible y eficaz de un gen en células vegetales.

30 La presente invención se refiere a un procedimiento que utiliza un fragmento de ARN sentido y un fragmento de ARN antisentido de un gen diana para alterar la expresión del gen en una célula vegetal. La invención proporciona de este modo un procedimiento para alterar la expresión de un gen diana en una célula vegetal que comprende introducir en una célula vegetal un fragmento de ARN sentido de un gen diana y un fragmento de ARN antisentido de dicho gen diana, en el que dicho fragmento de ARN sentido y dicho fragmento de ARN antisentido son capaces de formar una molécula de ARN bicatenaria, en el que la expresión de dicho gen diana en dicha célula se altera y en el que dichos fragmentos de ARN se introducen en la célula vegetal mediante expresión de dichas primera y segunda secuencias de ADN, como se ha descrito anteriormente.

35 Como se ha observado anteriormente, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende introducir en una célula vegetal una primera secuencia de ADN capaz de expresar en dicha célula un fragmento de ARN sentido de un gen diana y una segunda secuencia de ADN capaz de expresar en dicha célula un fragmento de ARN antisentido de dicho gen diana, en el que dicho fragmento de ARN sentido y dicho fragmento de ARN antisentido son capaces de formar una molécula de ARN bicatenaria, en el que la expresión de dicho gen diana en dicha célula está alterada. En una realización preferida, la primera secuencia de ADN y la segunda secuencia de ADN están integradas de forma estable en el genoma de la célula vegetal. En otra realización preferida, la primera secuencia de ADN y la segunda secuencia de ADN están presentes en la célula vegetal en una molécula extracromosómica, por ejemplo, en una molécula autorreplicativa.

40 Como se ha observado anteriormente, las secuencias de ADN están comprendidas en una molécula de ADN. Preferentemente, la primera y segunda secuencias de ADN están comprendidas en la misma hebra de ADN de la molécula de ADN y, preferentemente, el fragmento de ARN sentido y el fragmento de ARN antisentido están comprendidos en o se expresan como una molécula de ARN codificada por la molécula de ADN. En este caso, la molécula de ADN comprende adicionalmente un promotor ligado operativamente a la primera o segunda secuencias de ADN, siendo capaz el promotor de transcribir la primera y segunda secuencias de ADN. El promotor se liga operativamente preferentemente a la secuencia de ADN que codifica el fragmento antisentido que está a su vez ligado operativamente a la secuencia de ADN que codifica el fragmento sentido. Como alternativa, el promotor se

liga operativamente a la secuencia de ADN que codifica el fragmento sentido que está a su vez ligado operativamente a la secuencia de ADN que codifica el fragmento antisentido. Usando una molécula de ARN sencilla los dos fragmentos de ARN complementarios están en proximidad cercana de modo que se favorece el emparejamiento y la formación de dobles cadenas. Como alternativa, cuando las secuencias de ADN están comprendidas en la misma hebra de ADN, se producen dos moléculas de ARN separadas, por ejemplo, una molécula de ARN que comprende un fragmento de ARN sentido y una molécula de ARN que comprende un fragmento de ARN antisentido. En este caso, la molécula de ADN comprende además elementos reguladores capaces de expresar los fragmentos de ARN. En una realización preferida, tales elementos reguladores comprenden un promotor divergente bi-direccional que se sitúa entre la secuencia de ADN que codifica el fragmento de ARN sentido y la secuencia de ADN que codifica el fragmento de ARN antisentido. En otra realización preferida, dos promotores distintos, que comprenden el mismo promotor o, como alternativa, diferentes promotores, se sitúan entre las dos secuencias de ADN. En otra realización preferida más, la molécula de ADN comprende un primer promotor ligado operativamente a la primera secuencia de ADN y un segundo promotor ligado operativamente a la segunda secuencia de ADN, situándose las secuencias de ADN entre los dos promotores y siendo capaces los dos promotores de dirigir la transcripción en direcciones opuestas. La secuencia de ADN comprende además un engarce entre las secuencias de ADN que codifican dichos dos fragmentos de ARN complementarios. El engarce comprende secuencias reguladoras, comprendiendo dichas secuencias reguladoras señales de procesamiento de intrones.

En las moléculas de ADN de la presente invención, las secuencias de ADN se ligan operativamente preferentemente a los promotores. En una realización preferida, un promotor en la molécula de ADN comprende un promotor nativo de dicho gen diana nativo a inactivar, para asegurar que el ARN bicatenario está presente en los mismos tejidos y en el mismo momento del desarrollo en el que se expresa el gen diana. En otra realización, el promotor es un promotor heterólogo, por ejemplo un promotor específico de tejido, un promotor regulado por el desarrollo, un promotor constitutivo, promotor divergente o uno inducible. En otra realización preferida el gen es un gen heterólogo en dicha célula vegetal. Opcionalmente también se incluye señal de terminación en las moléculas de ADN.

La molécula de ARN sencilla o las dos moléculas de ARN distintas son capaces de formar una región bicatenaria, en la que las partes complementarias de los fragmentos de ARN se reconocen entre sí, en emparejan entre sí y forman la molécula de ARN bicatenaria. Las moléculas de ADN de la presente invención se transforman en células vegetales usando procedimientos bien conocidos en la técnica o descritos posteriormente. Por ejemplo, se usa bombardeo de microproyectiles, microinyección o transformación mediada por *Agrobacterium*. Además, se usa la transformación de protoplastos con moléculas de ADN de la presente invención usando electroporación o tratamiento químico (por ejemplo, tratamiento con PEG).

Como alternativa, se usan vectores virales para introducir moléculas de ADN de la presente invención en células vegetales, por ejemplo, a través de la llamada agroinfección. En otra realización preferida, se introducen moléculas de ADN en células vegetales por infiltración en vacío o frotando en la superficie de la hoja. Los procedimientos pueden dar como resultado células vegetales que comprenden los fragmentos de ARN sentido y antisentido de la presente invención, estando alterada la expresión de dicho gen diana en dicha célula vegetal por dichos fragmentos de ARN, derivando una planta y la descendencia de la misma de la célula vegetal y derivando semillas de la planta.

En la presente invención, la longitud de la región complementaria entre los fragmentos de ARN sentido y antisentido comprende de forma deseable al menos 15 nucleótidos de longitud, de forma más deseable al menos 50 nucleótidos de longitud, preferentemente al menos 500 pb de longitud. Preferentemente, la región complementaria es de menos de 5 kb, más preferentemente menos de 2 kb. Opcionalmente, la región complementaria entre los fragmentos de ARN sentido y antisentido comprende la región codificante del gen diana. En otra realización preferida, la región complementaria comprende regiones no traducidas (UTR) del gen diana, por ejemplo, 5' UTR o 3' UTR. En otra realización preferida, una secuencia de ADN que codifica un fragmento de ARN sentido o antisentido de la presente invención deriva de una molécula de ADNc. En otra realización, las secuencias complementarias comprenden elementos reguladores del gen diana cuya expresión se altera, tales como señales promotoras o de terminación.

En otra realización preferida, la región complementaria entre los fragmentos de ARN sentido y antisentido es idéntica a la secuencia correspondiente del gen cuya expresión se altera. En otra realización preferida, la región complementaria entre los fragmentos de ARN sentido y antisentido es sustancialmente similar a la secuencia correspondiente del gen cuya expresión se altera y aún es capaz de alterar la expresión del gen. En este caso, la región complementaria es de forma deseable al menos 50 % idéntica a la secuencia correspondiente del gen cuya expresión se altera, de forma más deseable al menos 70 % idéntica, preferentemente al menos 90 % idéntica, más preferentemente al menos 95 % idéntica. Por lo tanto, usar una molécula de ARN bicatenaria sencilla permite alterar la expresión de un gen sencillo o de una pluralidad de genes, comprendiendo el gen sencillo secuencias idénticas al ARN bicatenario o siendo sustancialmente similar al ARN bicatenario.

En otra realización preferida, la región complementaria entre los fragmentos de ARN sentido y antisentido no contiene ningún emparejamiento erróneo entre los fragmentos de ARN sentido y antisentido. En otra realización preferida, la región complementaria entre los fragmentos de ARN sentido y antisentido comprende al menos un emparejamiento erróneo entre los fragmentos de ARN sentido y antisentido y los dos fragmentos de ARN aún son capaces de emparejarse y formar una molécula de ARN bicatenaria, alterando de este modo la expresión del gen. De forma deseable, existen menos de 50 % de emparejamientos erróneos entre los fragmentos de ARN sentido y

antisentido en la región complementaria, de forma más deseable menos de 30 % de emparejamientos erróneos, preferentemente menos de 20 % de emparejamientos erróneos, más preferentemente menos de 10 % de emparejamientos erróneos, aún más preferentemente menos de 5 % de emparejamientos erróneos.

5 Se usa un procedimiento de la presente invención por ejemplo para alterar la expresión de un gen implicado en una ruta metabólica de una célula vegetal, en resistencia o susceptibilidad de una planta a enfermedades o en diferenciación celular. Tales alteraciones dan como resultado plantas con rasgos mejorados comercialmente importantes, tales como modificaciones de la ruta metabólica particular, resistencia a enfermedades o cambios en la diferenciación celular. Se describen otros ejemplos de genes diana por ejemplo en las patentes de Estados Unidos 5.107.065, 5.283.184 y 5.034.323, incorporadas en el presente documento por referencia. Un procedimiento de la presente invención también se usa para alterar la expresión de un gen para desentrañar su función. En este caso, por ejemplo, las secuencias de ADN capaces de expresar fragmentos de ARN sentido y antisentido del gen se introduce en una célula vegetal por un procedimiento de transformación bien conocido en la técnica o descrito posteriormente. Las secuencias de ADN se integran por ejemplo de forma estable en el genoma de la célula vegetal. La célula vegetal se examina después con respecto a por ejemplo cambios fenotípicos o metabólicos. Como alternativa, una planta se regenera de la célula vegetal y la planta o su descendencia se examina con respecto a, por ejemplo, cambios fenotípicos o metabólicos. Por ejemplo, se descubren genes esenciales usando un procedimiento tal y explorando las plantas transformadas con respecto a por ejemplo, letalidad de embriones, letalidad de plántulas u otros fenotipos relevantes. El conocimiento de la función del gen se usa después para producir cultivos con propiedades mejoradas por transformación genética o para explorar con respecto a nuevos agentes químicos. En particular, los genes esenciales son buenos candidatos como dianas para compuestos herbicidas. Las secuencias de genes esenciales, se sobreexpresan por ejemplo en una planta para conferir resistencia a la planta a un compuesto herbicida que inhibe la función de la enzima de origen natural codificada por el gen. También se producen variantes mutadas del gen esencial y se exploran con respecto a tolerancia al compuesto herbicida o a compuestos relacionados. Tales variantes mutadas se producen por diversos procedimientos conocidos en la técnica. La enzima codificada por el gen esencial también se usa para explorar con respecto a compuestos que inhiben su función, por ejemplo, en una exploración de alto rendimiento *in vitro*. Los compuestos de inhibición se ensayan después con respecto a actividad herbicida.

Un procedimiento de la presente invención también se usa para alterar de forma aleatoria la expresión de genes sin conocimiento previo de su secuencia de nucleótidos. En este caso, se prepara una biblioteca de fragmentos de ARN aleatorios capaces de emparejarse y formar moléculas de ARN bicatenarias o una biblioteca de secuencias de ADN aleatorias que codifican fragmentos de ARN capaces de emparejarse y formar una molécula de ARN bicatenaria y se introducen en células vegetales usando procedimientos bien conocidos en la técnica o descritos posteriormente. Las células vegetales o plantas transformadas se exploran con respecto a una propiedad o fenotipo particular. Por ejemplo, se descubren genes esenciales como se ha descrito anteriormente usando tal exploración. Otro ejemplo de una exploración es para crecimiento no obstaculizado o crecimiento menos obstaculizado que las células no transformadas en diversas condiciones, tales como mayor salinidad o presión osmótica, mayor temperatura, presencia de sustancias tóxicas o perjudiciales, por ejemplo, compuestos herbicidas. Después de tal exploración, la molécula de ARN bicatenaria o la molécula de ADN que codifica el ARN bicatenario se recupera y la secuencia de los fragmentos de ARN complementarios se determina, permitiendo de este modo aislar el gen cuya alteración de expresión es responsable de la propiedad o fenotipo particular. Dicho gen se usa después por ejemplo, para mejorar los cultivos por transformación genética o para explorar con respecto a nuevos agentes químicos.

Tecnología de transformación de Plantas

Se incorporan moléculas de ADN de la presente invención en células vegetales o bacterianas usando tecnología de ADN recombinante convencional. En general, una molécula de ADN de la presente invención está comprendida en un vector de transformación. Se usa un gran número de tales sistemas de vector conocidos en la técnica, tales como plásmidos, virus bacteriófagos y otros virus modificados. Los componentes del sistema de expresión también se modifican, por ejemplo, para aumentar la expresión de los fragmentos de ARN sentido y antisentido. Por ejemplo, se emplean secuencias truncadas, sustituciones de nucleótidos u otras modificaciones. Se usan sistemas de expresión conocidos en la técnica para transformar virtualmente cualquier célula vegetal de cultivo en condiciones adecuadas. Un transgén que comprende una molécula de ADN de la presente invención se transforma preferentemente de forma estable y se integra en el genoma de las células huésped. En otra realización preferida, el transgén que comprende una molécula de ADN de la presente invención se localiza en un vector autorreplicativo. Los ejemplos de vectores autorreplicativos son virus, en particular, virus gemini. Las células transformadas se regeneran preferentemente en plantas completas.

55 Las plantas transformadas de acuerdo con la presente invención pueden ser monocotiledóneas o dicotiledóneas e incluyen, pero sin limitación maíz, trigo, cebada, centeno, yuca, judías, guisantes, achicoria, lechuga, repollo, coliflor, brócoli, nabo, rábano, espinaca, espárrago, ajo, cebolla, pimienta, apio, calabaza, calabaza gigante, cáñamo, calabacín, manzana, pera, membrillo, melón, ciruela, cereza, melocotón, nectarina, albaricoque, fresa, uva, frambuesa, arándano, piña, aguacate, papaya, mango, banana, soja, tomate, sorgo, caña de azúcar, remolacha, girasol, colza, trébol, tabaco, zanahoria, algodón, alfalfa, arroz, patata, berenjena, pepino, *Arabidopsis*, y plantas leñosas tales como coníferas y árboles de caducifolios. Una vez que se ha transformado una secuencia de nucleótidos deseada en una especie de planta particular, puede propagarse en esa especie o moverse a otras

variedades de la misma especie, particularmente incluyendo variedades comerciales, usando técnicas de cultivo tradicionales.

A. Requisitos para la construcción de casetes de expresión de plantas

5 Las secuencias génicas pretendidas para expresión en plantas transgénicas se ensamblan primero en casetes de expresión detrás de un promotor adecuado expresable en plantas. Los casetes de expresión también pueden comprender cualquier secuencia adicional requerida o seleccionada para la expresión del transgén. Tales secuencias incluyen, por ejemplo, pero sin restricción, terminadores de la transcripción, secuencias ajenas para potenciar la expresión tales como intrones, secuencias vitales y secuencias pretendidas para la dirección del producto génico a orgánulos y compartimentos celulares específicos. Estos casetes de expresión pueden después transferirse fácilmente a los vectores de transformación vegetales descritos posteriormente. Lo siguiente es una descripción de diversos componentes de casetes de expresión típicos.

1. *Promotores*

15 La selección del promotor usado en los casetes de expresión determina el patrón de expresión espacial y temporal del transgén en la planta transgénica. Los promotores seleccionados expresan transgenes en tipos celulares específicos (tales como células epidérmicas de la hoja, células del mesófilo, células de córtex de la raíz) o en tejidos u órganos específicos (raíces, hojas o flores, por ejemplo) y la selección refleja la localización deseada de acumulación del producto génico. Como alternativa, el promotor seleccionado conduce la expresión del gen en diversas condiciones de inducción. Los promotores varían en su fuerza, es decir, capacidad para promover la transcripción. Dependiendo del sistema de célula huésped utilizado, se usa cualquiera de varios promotores adecuados conocidos en la técnica. Por ejemplo, para expresión constitutiva, se usan el promotor 35S de CaMV, el promotor de actina del arroz o el promotor de ubiquitina. Por ejemplo, para expresión regulable, se usa el promotor de PR-1 inducible químicamente de tabaco o *Arabidopsis* (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.689.044).

25 Una categoría preferida de promotores es la que es inducible por lesión. Se han descrito numerosos promotores que se expresan en sitios de lesión. Los promotores preferidos de este tipo incluyen los descritos por Stanford y col. Mol. Gen. Genet. 215: 200-208 (1989), Xu y col. Plant Molec. Biol. 22: 573-588 (1993), Logemann y col. Plant Cell 1: 151-158 (1989), Rohrmeier y Lehle, Planta Molec. Biol. 22: 783-792 (1993), Firek y col. Plant Molec. Biol. 22: 129-142 (1993), y Warner y col. Plant J. 3: 191-201 (1993).

30 Los patrones de expresión específicos de tejido preferidos incluyen específicos de tejido verde, específicos de raíz, específicos de tallo y específicos de flor. Los promotores adecuados para expresión en tejido verde incluyen muchos que regulan genes implicados en la fotosíntesis y muchos de estos se han clonado a partir de tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Un promotor preferido es el promotor PEPC del maíz del gen de fosfoenol carboxilasa (Hudspeth y Grula, Plant Molec Biol 12:579-589 (1989)). Un promotor preferido para expresión específica de raíz es el descrito por Framond (FEBS 290: 103-106 (1991), documento EP 0 452 269 y un promotor específico de raíz preferido adicional es el del gen T-1 proporcionado por esta invención. Un promotor específico de tallo preferido es el descrito en la patente de Estados Unidos 5.625.136 y que conduce la expresión del gen *trpA* del maíz.

40 Las realizaciones preferidas de la invención son plantas transgénicas que expresan secuencia de nucleótidos de una manera específica de raíz. Son realizaciones preferidas adicionales plantas transgénicas que expresan la secuencia de nucleótidos de una manera inducible por lesión o inducible por infección de patógenos.

2. *Terminadores de la transcripción*

45 Están disponibles una diversidad de terminadores de la transcripción para su uso en casetes de expresión. Estos son responsables de la terminación de transcripción detrás del transgén y su correcta poliadenilación. Son terminadores de la transcripción apropiados los que se sabe que actúan en plantas e incluyen el terminador 35S de CaMV, el terminador *tml*, el terminador de nopalina sintasa y el terminador E9 de *rbcS* del guisante. Estos se usan en plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas

3. *Secuencias para la potenciación o regulación de la expresión*

50 Se ha descubierto que numerosas secuencias potencian la expresión génica desde dentro de la unidad transcripcional y estas secuencias pueden usarse junto con los genes de la presente invención para aumentar su expresión en plantas transgénicas. Por ejemplo, se han mostrado que diversas secuencias de intrones tales como intrones del gen *Adhl* del maíz potencian la expresión, particularmente en células monocotiledóneas. Además, también se sabe que varias secuencias líder no traducidas derivadas de virus potencian la expresión y estas son particularmente eficaces en células dicotiledóneas.

4. *Optimización de secuencia codificante*

55 La secuencia codificante del gen seleccionado puede modificarse por ingeniería genética alterando la secuencia

codificante para expresión óptima en la especie de cultivo de interés. Se conocen bien procedimientos para modificar secuencias codificantes para conseguir expresión óptima en una especie de cultivo particular (véase, por ejemplo Perlak y col, Proc Natl Acad Sci USA. 88: 3324 (1991), y Koziel y col, Bio/technol. 11: 194 (1993)).

5 En otra realización preferida, una molécula de ADN de la presente invención se transforma directamente en el genoma de plastidio. La tecnología de transformación de plastidio se describe de forma exhaustiva en las patentes de Estados Unidos N° 5.451.513, 5.545.817 y 5.545.818 en la solicitud de PCT N° WO 95/16783 y en McBride y col. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 7301-7305. La técnica básica para transformación de cloroplasto implica introducir regiones de ADN de plastidio clonado que flanquean un marcador seleccionable junto con el gen de interés en un tejido diana adecuado, por ejemplo, usando biolística o transformación de protoplastos (por ejemplo, cloruro cálcico o transformación mediada por PEG). Las regiones flanqueantes de 1 a 1,5 kb, denominadas secuencias de dirección, facilitan la recombinación homóloga con el genoma de plastidios y de este modo permiten el reemplazo o modificación de regiones específicas del plastoma. Inicialmente, se utilizan mutaciones puntuales en el ARNr de 16S del cloroplasto y los genes *rps2* que confieren resistencia a espectinomicina y/o estreptomycinina se utilizan como marcadores seleccionables para la transformación (Svab, Z., Hajdukiewicz, P., y Maliga, P. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 8526-8530; Staub, JM, y Maliga, P. (1992) Plant Cell 4, 39-45). La presencia de sitios de clonación entre estos marcadores permitió la creación de un vector que se dirige a plastidios para la introducción de moléculas de ADN ajenas (Staub, JM, y Maliga, P. (1993) EMBO J. 12, 601-606). Se obtienen aumentos sustanciales de la frecuencia de transformación por reemplazo de los genes de resistencia a antibióticos de proteína r o ARNr recesivos con un marcador seleccionable dominante, el gen *aadA* bacteriano que codifica la enzima detoxificante de espectinomicina aminoglucósido-3'-adeniltransferasa (Svab, Z., y Maliga, P. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90, 913-917). Previamente, este marcador se había usado de forma exitosa para la transformación de alta frecuencia del genoma del plastidio del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Goldschmidt-Clermont, M. (1991) Nucl Acids Res 19:4083-4089). Otros marcadores seleccionables útiles para la transformación de plastidios se conocen en la técnica y están abarcados dentro del alcance de la invención.

25 Expresión de plastidios, en la que los genes se insertan por recombinación homóloga en las varias miles de copias del genoma de plastidio circular presente en cada célula vegetal. En una realización preferida, se inserta un ADN de la presente invención en un vector de dirección de plastidios y se transforma en el genoma de plastidios de un huésped vegetal deseado. Se obtienen plantas homoplásmicas para genomas de plastidio que contienen la molécula de ADN de la presente invención y son capaces preferentemente de alta expresión de la molécula de ADN. Preferentemente, los fragmentos de ARN sentido y antisentido codificados por la molécula de ADN son capaces de emparejarse y de formar moléculas de ARN bicatenarias en plastidios vegetales para alterar la expresión de genes de plastidio. En una realización preferida, los fragmentos sentido y antisentido no comprenden ningún emparejamiento erróneo en la región complementaria. En otra realización preferida, los fragmentos sentido y antisentido comprenden al menos un emparejamiento erróneo en la región complementaria. En este caso, las secuencias de ADN en la molécula de ADN que codifica los fragmentos de ARN no son capaces de recombinar entre sí.

B. Construcción de vectores de transformación de plantas

Se conocen numerosos vectores de transformación disponibles para transformación de plantas por los expertos en la materia de transformación de plantas y los genes pertinentes para la presente invención pueden usarse junto con cualquiera de tales vectores. La selección del vector depende de la técnica de transformación preferida y las especie diana para la transformación. Para ciertas especies diana, se prefieren diferentes marcadores de selección antibióticos o herbicidas. Los marcadores de selección usados habitualmente en la transformación incluyen el gen *nptII*, que confiere resistencia a kanamicina y antibióticos relacionados (Messing Y Vierra. Gene 19: 259-268 (1982), Bevan y col, Nature 304: 184-187 (1983)), el gen *bar* que confiere resistencia al herbicida fosfinotricina (White y col, Nucl Acids Res. 18: 1062 (1990), Spencer y col Theor. Appl. Genet 79:625-631 (1990)), el gen *hph*, que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Blochinger y Diggelmann, Mol Cell Biol. 4: 2929-2931), el gen *manA*, que permite la selección positiva en presencia de manosa (Miles y Guest (1984) Gene 32:41-48; patente de Estados Unidos N 5.767.378), y el gen *dhfr*, que confiere resistencia a metotrexato (Bourouis y col, EMBO J. 2 (7):. 1099-1104 (1983)), y el gen EPSPS, que confiere resistencia a glifosfato (Patente de Estados Unidos N° 4.940.935 y 5.188.642).

1. *Vectores adecuados para transformación de Agrobacterium*

Están disponibles muchos vectores para la transformación usando *Agrobacterium tumefaciens*. Estos portan típicamente al menos una secuencia límite de ADN-T e incluyen vectores tales como pBIN19 (Bevan, Nucl. Acids Res. (1984). Los vectores típicos adecuados para transformación de *Agrobacterium* incluyen los vectores binarios pCIB200 y pCIB2001, así como el vector binario pCIB10 y derivados de selección de higromicina de los mismos. (Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.639.949).

2. *Vectores adecuados para transformación no de Agrobacterium*

La transformación sin el uso de *Agrobacterium tumefaciens* evita el requisito de secuencias de ADN-T en el vector de transformación seleccionado y en consecuencia se utilizan vectores que carecen de estas secuencias además de

5 vectores tales como los descritos anteriormente que contienen secuencias ADN-T. Las técnicas de transformación que no se basan en *Agrobacterium* incluyen transformación mediante bombardeo de partículas, captación de protoplastos (por ejemplo, PEG y electroporación) y microinyección. La selección de vector depende en gran medida de la selección preferida para las especies que se transforman. Los vectores típicos adecuados para la transformación sin *Agrobacterium* incluyen pCIB3064, pSOG19 y pSOG35. (Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.639.949).

C. Técnicas de transformación

10 Una vez que la secuencia de ADN de interés se clona en un sistema de expresión, se transforma en una célula vegetal. Los procedimientos para la transformación y regeneración de plantas se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se han utilizado vectores de plásmido Ti para el suministro de ADN ajeno, así como captación de ADN directa, liposomas, electroporación, microinyección y microproyectiles. Además, pueden utilizarse bacterias del género *Agrobacterium* para transformar células vegetales. Las técnicas de transformación para dicotiledóneas se conocen bien en la técnica e incluyen técnicas basadas en *Agrobacterium* y técnicas que no requieren *Agrobacterium*. Las técnicas sin *Agrobacterium* implican la captación de material genético exógeno directamente por protoplastos o células. Esto se consigue por PEG o captación mediada por electroporación, suministro mediado por bombardeo de partículas o microinyección. En cada caso, las células transformadas se regeneran a plantas completas usando técnicas convencionales conocidas en la materia. La transformación de la mayoría de especies de monocotiledóneas también se ha hecho ahora rutinaria. Las técnicas preferidas incluyen transferencia génica directa en los protoplastos usando PEG o técnicas de electroporación, bombardeo de partículas en tejido calloso, así como transformación mediada por *Agrobacterium*.

Las plantas de acontecimientos de transformación se dejan crecer, se propagan y cultivan para producir descendencia con el rasgo deseado y se obtiene semillas con el rasgo deseado, usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

25 La invención se describirá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos detallados. Estos ejemplos se proporcionan solamente con fines de ilustración y no se pretende que sean limitantes a no ser que se especifique de otro modo.

Ejemplos

30 Las técnicas de ADN recombinante convencionales y de clonación molecular usadas en el presente documento se conocen bien en la técnica y se describen en Sambrook, y col, Molecular Cloning, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), en T.J. Silhavy, M.L. Berman, y L.W. Enquist, Experimentals with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en Ausubel, FM y col, Current Protocols in Molecular Biology, pub. por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987).

Ejemplo 1: Regulación de la expresión de un gen de luciferasa

35 Construcción de una molécula de ADN quimérica que codifica fragmentos de ARN de luciferasa sentido y antisentido (construcción sentido / antisentido)

40 Se amplifica un fragmento orientado "sentido" de 738 pb del gen de luciferasa de luciérnaga del plásmido pLuc+ (Promega) de ADN del plásmido pPH108 usando los cebadores oligonucleotídicos ds_Luc1 (5'-CGC GGA TCC CGC TGG AAG ACG CCA AAA ACA-3', SEC ID N° 1; sitio de restricción *Bam*HI subrayado) y ds_Luc2 (5'-CGG AAG CTT AGG CTC GCC TAA TCG CAG TAT CCG GAA TG-3', SEC ID N° 2; sitio de restricción *Hind*III subrayado). Se usa ADN polimerasa termoestable TurboPfu (Stratagene) en reacciones de 50 µl de acuerdo con el protocolo del fabricante con cinco ciclos de 95 °C/1 min, 55 °C/1,5 min, 72 °C/2 min seguido de veinticinco ciclos de 95 °C/1 min, 72 °C/3,5 min. De una manera similar un fragmento orientado "antisentido" de 737 pb del gen de luciferasa de luciérnaga del plásmido pLuc+ se amplifica por PCR a partir de ADN del plásmido pPH108 usando los cebadores oligonucleotídicos ds_Luc3 (5'- CGG TCT AGA GGA AGA CGC CAA AAA CAT A-3', SEC ID N° 3; sitio de restricción *Xba*I subrayado) y ds_Luc2 (5'-CGG AAG CTT AGG CTC GCC TCG TAA CAG TAT CCG GAA TG-3', SEC ID N° 4; sitio de restricción *Hind*III subrayado). Los fragmentos de ADN resultantes se purifican por electroforesis a través de un gel de Tris-acetato 1 % preparado a partir de agarosa de punto de fusión bajo (FMC), seguido de extracción con fenol-cloroformo de los cortes de gel escindidos que contienen los productos de PCR. El ADN del producto sentido (ds_Luc1/2) se digiere con *Bam*HI y *Hind*III y el ADN del producto antisentido (ds_Luc3/2) se digiere con *Xba*I y *Hind*III de acuerdo con procedimientos convencionales (las enzimas de restricción se obtuvieron de New England Biolabs). Los fragmentos de ADN de extremos adhesivos resultantes se purificaron en gel como se ha descrito anteriormente. Un fragmento de ADN que contiene el promotor *mas* 1' (Velten y col (1984) EMBO J. 3: 2723-2730) se obtiene digiriendo el plásmido CSA104 con *Eco*RI y *Hin*CI y purificando un fragmento de ADN de 564 pb. Este fragmento se vuelve a digerir con *Bam*HI y el subfragmento *Eco*RI-*Bam*HI de 484 pb que contiene el promotor *mas* 1' se aísla y se purifica en gel. Para construir el plásmido pPH169, se digiere ADN del vector de clonación pLitmus29 (New England Biolabs) con *Eco*RI y *Xba*I y el fragmento aislado se liga en una reacción de cuatro vías usando ADN ligasa T4 (New England Biolabs) con el fragmento *Eco*RI - *Bam*HI de promotor *mas* 1' y los fragmentos del gen de luciferasa ds_Luc sentido (*Bam*HI - *Hind*III) y antisentido (*Hind*III - *Xba*I).

Para construir el vector binario pPH170 para la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* con la construcción ds_Luc1/2/3 sentido/antisentido, se digiere ADN del plásmido binario pSGCHC1 que porta un gen de resistencia a kanamicina para selección bacteriana y un gen de resistencia a higromicina para selección de planta transgénica con *EcoRI* y *XbaI*. El fragmento aislado de 11,6 kb resultante de pSGCHC1 se liga en una reacción de cuatro vías usando ADN ligasa T4 (New England Biolabs) con el fragmento *EcoRI* - *BamHI* con promotor *mas 1'* y los fragmentos de gen de luciferasa ds_Luc sentido (*BamHI* - *HindIII*) y antisentido (*HindIII* - *XbaI*).

Transformación de *Agrobacterium* e infiltración de vacío de plantas de *Arabidopsis*

Se introducen plásmidos pPH170 en GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación y las colonias transformadas se seleccionan y amplifican. Las plantas de cuatro a cinco semanas de edad de líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* que expresan luciferasa constitutivamente (promotor UBQ3 (Norris y col (1993) PMB 21: 895-906) / UBQ3 + CaMV 35S 5'UTR/luc+, *pPH108*) o de forma inducible (promotor PR-1 de *Arabidopsis*/luc+; *pPH135*, línea 6E) se infiltran por vacío con clones de *Agrobacterium* que portan el vector de ADN-T binario pPH170. Las plantas transformadas se co-seleccionan en higromicina y kanamicina y se cultivan en condiciones de fitotróp controladas para la determinación de actividad luciferasa. Además, se evalúa la actividad luciferasa en el fondo de *pPH135-6E* 48 horas después de la inducción con BTH (tratamiento de BTH esencialmente como se describe en Lawton y col. Plant J. 10: 71-82). La actividad luciferasa se cuantifica usando un ensayo basado en luminiscencia en extractos tisulares después de la adición de sustrato luciferina. La actividad luciferasa también se controla en la planta usando un sistema de formación de imágenes en vídeo enfriado por CCD (Hamamatsu).

Ejemplo 2: Regulación de la expresión del gen GL1 de *Arabidopsis*

El gen GL1 codifica un factor de transcripción de tipo *myb* que se requiere para el inicio de la formación de tricoma normal (vello de las hojas) (Oppenheimer y col (1991) Cell 67: 483-493). El knockout de expresión de GL1 temprano en el desarrollo da como resultado plantas sin tricomas. El fenotipo knockout es fácil de identificar en plántulas jóvenes y no es letal. Se construyen tres vectores para expresión constitutiva y tres vectores para expresión regulada por GAL4/C1. Los tres vectores diferentes para ensayar con respecto a cada promotor son de expresión sentido (+), expresión antisentido (-) y expresión de ARN sentido y antisentido (+/-) de un fragmento génico de GL1. Los vectores (+) y (-) son controles para comparar con respecto a su efecto en la expresión de GL1. En cada caso se usa un fragmento 5' de las bases N° 739 a N° 1781 de la secuencia de GL1 (N° de acceso de GenBank M79448) para construcción del vector.

Expresión regulada por GAL4/C1

Los fragmentos génicos de GL1 se clonan en la construcción de vector inducible por cruce pJG304-1 como fragmentos *NcoI*-*SacI*. El plásmido pJG304 deriva de pBSSK+. El plásmido pBS SK+ (Stratagene, La Jolla, CA) se linealiza con *SacI*, se trata con nucleasa de soja verde para retirar el sitio *SacI* y se vuelve a ligar con ligasa T4 para preparar pJG201. El sitio de unión consenso de 10XGAL4/promotor mínimo 35S de CaMV/gen GUS/ casete terminador de CaMV se retira de pAT71 con *KpnI* y se clona en el sitio de *KpnI* de pJG201 para preparar pJG304. El plásmido pJG304 se digiere parcialmente con endonucleasa de restricción *Asp718* para aislar un fragmento lineal de longitud completa. Este fragmento se liga con un exceso molar del oligonucleótido de 22 bases JG-L (5'-GTA CCT CGA GTC TAG ACT CGA G-3', SEC ID N°: 5). Se usa análisis de restricción para identificar un clon con este engarce insertado 5' en el sitio de unión de ADN de GAL4 y este plásmido se designa pJG304DXhol.

Se añaden sitios *NcoI* y *SacI* a los extremos de fragmentos (+) y (-) sintetizando cebadores de PCR con los sitios de escisión apropiados para los extremos 5'. El fragmento de GL1 (+/-) se produce produciendo primero dos fragmentos: un fragmento (+) con el sitio *NcoI* en el extremo 5' y un sitio *HindIII* en el extremo 3' y un fragmento (-) con un sitio *HindIII* en el extremo 5' y un sitio *SacI* en el extremo 3'. La unidad (+/-) se produce por ligación de los fragmentos resultantes en el sitio *EcoRI*. La unidad de expresión contiene el dominio de unión de ADN de GAL4, seguido de una secuencia TATA mínima y el fragmento génico GL1 orientado (+), (-) o (+/-) (Guyer y col (1998) Genetics, 149: 633-639).

Expresión constitutiva

Se usa el promotor *mas 1'* de manopina sintasa de *Agrobacterium* (Velten y col (1984) EMBO Journal 3: 2723-2730), uno relativamente fuerte y constitutivo en plantas dicotiledóneas. Como anteriormente, los fragmentos GL1 (+), (-) y (+/-) se ligan detrás del promotor 1' en pBluescript. Los tres casetes de expresión diferentes se ligan en pCIB200 como fragmentos *EcoRI*/*Sall* (Uknes y col (1993) Plant Cell 5: 159-169).

Ejemplo 3: Regulación de la expresión del gen de cistationina beta-liasa

El gen de cistationina beta-liasa (CBL) codifica una proteína que lleva a cabo una etapa en la ruta de biosíntesis de metionina. CBL cataliza la conversión de cistationina a homocisteína (revisado en Ravanel y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 95: 7805-7812). La secuencia de un ADNc para el gen de CBL de *Arabidopsis* se ha identificado (Ravanel y col (1995) Plant Mol. Biol. 29: 875-882). El efecto de la regulación de su expresión en plantas se ensaya usando construcciones para expresión de ARN sentido (construcción sentido), expresión de ARN antisentido (construcción antisentido) y expresión de ARN sentido y antisentido (construcción sentido/antisentido).

A. Construcción antisentido: se usa vector de BASTA binario pJG261 que contiene un fragmento del vector pJG304Dxhol con una inserción de parte del gen de CBL en una orientación antisentido (nucleótidos N° 13-1159, N° de acceso de Genbank L40511).

5 pJG304/aCBL: el plásmido pJG304Dxhol se digiere con *NcoI* y *SacI* para escindir el gen GUS. El gen GUS de pJG304Dxhol se reemplaza con un producto de PCR de CBL también digerido con *NcoI* y *SacI*. Este producto se genera usando los cebadores DG354 (5'-GAT CGA GCT CCA CGA GAA CTG TCT CCG-3', SEC ID N° 6) y DG357 (5'-TCA GCC ATG GGA AGA CAA GTA CAT TGC-3', SEC ID N° 7) y la biblioteca de ADNc de *Arabidopsis* de pFL61 (Minet y col. (1992) Plant J. 2:417-422) como un molde. El plásmido pJG304/aCBL se construye a partir del vector digerido con pJG304Dxhol ligado con el producto de PCR CBL.

10 pJG261/aCBL: pJG304/aCBL se corta con *XhoI* para escindir el casete que contiene la fusión de sitio de unión a ADN GAL4/ promotor mínimo 35S/ CBL antisentido / terminador de CaMV. Este casete se liga en pJG261 digerido con *XhoI* (Guer, y col, Genetics (1998), 149: 633-639), produciendo pJG261/aCBL.

15 B. Construcción sentido: igual que la construcción antisentido, excepto que el fragmento de CBL está en la orientación opuesta. Esta construcción contiene el codón de partida ATG y la mayoría de la ORF de CBL y actúa como un control para la regulación de la expresión del gen de CBL.

20 pJG304/sCBL: el plásmido pJG304Dxhol se digiere con *NcoI* y *SacI* para escindir el gen GUS. El gen GUS de pJG304Dxhol se reemplaza con un producto de PCR de CBL también digerido con *NcoI* y *SacI*. Este producto se genera usando los cebadores CBL1 (5'-CTT GCC ATG GCA CGA GAA CTG TCT CCG-3', SEC ID N° 8) y CBL2 (5'-CAT GGA GCT CGA AGA CAA GTA CAT TGC A-3', SEC ID N° 9) y la biblioteca de ADNc de *Arabidopsis* de pFL61 como un molde. El plásmido pJG304/sCBL se construye a partir del vector digerido con pJG304Dxhol ligado con el producto de PCR de CBL.

25 pJG261/sCBL: pJG304/sCBL se corta con *XhoI* para escindir el casete que contiene la fusión de sitio de unión ADN de GAL4/ promotor mínimo 35S / CBL sentido / terminador de CaMV. Este casete se liga en pJG261 digerido con *XhoI*, produciendo pJG261/sCBL.

30 C. Construcción de sentido/antisentido: se inserta un fragmento de gen de CBL (N° 13-1159) en la orientación sentido en el sitio *SalI* del vector pJG304Dxhol cadena abajo de la versión de orientación antisentido del gen de CBL. Está presente un engarce de aproximadamente 10 pb entre las dos copias de CBL. pJG304/dsCBL: el plásmido pJG304/aCBL se digiere con *SacI*. Un producto de PCR de CBL también digerido con *SacI* se inserta de modo que el gen de CBL insertado está en la orientación sentido. Este producto se genera usando CBL2 (5'- CAT GGA GCT CGA AGA CAA GTA CAT TGC A-3', SEC ID N° 9) y CBL3 (5'- CAT CGA GCT CCT CTG TTT AAA CCA CGA GAA CTG TCT CCG TCG c-3', SEC ID N°: 10) y la biblioteca de ADNc de *Arabidopsis* de pFL61 como un molde. La construcción plasmídica con la orientación deseada del ADN insertado se identifica por digestión con *HindIII*. El plásmido pJG304/dsCBL se construye a partir del vector digerido con pJG304/aCBL ligado con el producto de PCR de CBL. Se usa SURE2 (Stratagene, La Jolla, CA) como el huésped bacteriano para estabilizar la construcción.

35 pJG261/dsCBL: pJG304/dsCBL se corta con *XbaI* para escindir el casete que contiene la fusión sitio de unión de ADN de GAL4/ promotor mínimo 35S/CBL antisentido CBL sentido / terminador de CaMV. Este casete se liga en pJG261 digerido con *SpeI*, produciendo pJG261/dsCBL. Se usa XL1-BLUE MRF' (Stratagene, La Jolla, CA) como el huésped bacteriano para estabilizar parcialmente la construcción. Se aísla ADN no reordenado para esta construcción por purificación en gel de agarosa.

D. Producción de plantas transgénicas con sitio de unión de GAL4/ 35S de CaMV mínimo/CBL

45 Las tres construcciones pJG261/CBL descritas se electro-transforman (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en *Agrobacterium tumefaciens recA⁻* cepa AGL1 (Lazo y col (1991) Bio/Technology 9:963-967) y las plantas de *Arabidopsis* (Ecotipo Columbia) se transforman por infiltración (Bechtold y col, (1993) C. R. Acad Sci Paris, 316: 1188-1193). Se seleccionan semillas de las plantas infiltradas en medio de germinación (sales Murashige-Skoog 4,3 g/litro, Mes a 0,5 g/l, sacarosa al 1 %, tiamina a 10 µg/litro, piridoxina a 5 µg/litro, ácido nicotínico a 5 µg/litro, mioinositol a 1 mg/litro, pH 5,8) que contiene Basta a 15 mg/litro.

E. Comparación de la inhibición de CBL usando un transactivador GAL4/C1 y un sitio de unión GAL4/promotor 35S mínimo

50 Se trasplantan plantas transgénicas que contienen una construcción de sitio de unión GAL4/promotor 35S de CaMV mínimo/CBL a suelo y se dejan crecer hasta la madurez en el invernadero. La presencia de un fragmento de CBL transgénico en cada línea se confirma por PCR. Para ensayar con respecto a la construcción antisentido, se usan cebadores ASV1 (5'- TTT GGA GAG GAC AGA CCT GC-3', SEC ID N° 11) y CBL3 (5'- CAT CGA GCT CCT CTG TTT AAA CCA CGA GAA CTG TCT CCG TCG C-3', SEC ID N°: 10) para verificar la presencia de un producto de aproximadamente 1200 pb. Se identifican seis líneas transgénicas con la construcción antisentido. Para ensayar con respecto a la construcción sentido, se usan

cebadores ASV2 (5'- GGA TTT TGG TTT TAG GAA TTA GAA-3'; SEC ID N° 12) y CBL3 (5'- CAT CGA GCT CCT CTG TTT AAA CCA CGA GAA CTG TCT CCG TCG C-3', SEC ID N° 10) para verificar la presencia de un producto de aproximadamente 1200 pb. Se identifican trece líneas transgénicas con la construcción sentido. Para ensayar con respecto a la construcción sentido/antisentido, se usan cebadores ASV2 (5'- GGA TTT TGG TTT TAG GAA TTA GAA -3', SEC ID N°: 12) y CBL3 (5'- CAT CGA GCT CCT CTG TTT AAA CCA CGA GAA CTG TCT CCG TCG C -3', SEC ID N° 10) para verificar la presencia de un producto de aproximadamente 1200 pb. Además, para ensayar con respecto a la construcción sentido/antisentido, se usan los cebadores ASV1 (5'- TTT GGA GAG GAC AGA CCT GC-3', SEC ID N° 11) y CBL3 (5'- CAT CGA GCT CCT CTG TTT AAA CCA CGA GAA CTG TCT CCG TCG C-3', SEC ID N° 10) para verificar la presencia de un producto de aproximadamente 1200 pb. Se identifican once líneas transgénicas con la construcción sentido/antisentido.

Las flores crecidas en los transformantes primarios se cruzan con polen de la línea de transactivador GAL4/C1 homocigoto pAT53-103 (Guyer y col, Genetics (1998) 149: 633-649). Las semillas F1 se siembran en placas en medio de MS + sacarosa 2 % (sales Murashige-Skoog a 4,3 g/litro, Mes a 0,5 g/litro, sacarosa 2 %). Ninguna de las líneas que comprenden la construcción antisentido muestra un fenotipo anómalo para la descendencia de F1 en las placas. Dos de trece líneas que comprenden la construcción sentido muestran un fenotipo débil para aproximadamente la mitad de la descendencia de F1 en cada placa. Las otras once de trece líneas que comprenden la construcción sentido no muestran un fenotipo anómalo para la descendencia de F1 en las placas. Diez de once líneas que comprenden la construcción sentido/antisentido muestran fenotipos que varían de débil a fuerte para aproximadamente la mitad de la descendencia de F1 en cada placa. Las placas con un fenotipo fuerte no sobreviven y tienen un aumento en la coloración púrpura, pierden pigmentación verde y no forman hojas después de catorce días en las placas. Las plantas con fenotipos más débiles tienen algo de coloración púrpura, son de un verde más claro de lo normal y forman hojas más pequeñas después de catorce días en las placas. Por lo tanto, una construcción sentido/antisentido es más eficaz en la reducción de la actividad de un gen esencial endógeno que una construcción antisentido o una sentido.

F. Regulación de la expresión de CBL usando dos promotores

El gen de CBL se sitúa entre dos promotores, uno que produce transcripción de la cadena sentido y el otro que produce transcripción de la cadena antisentido. En este enfoque se produce ARN tanto sentido que antisentido en una célula vegetal y los dos tipos de cadenas son capaces de hibridar entre sí lo que conduce a la formación de moléculas de ARN bicatenarias. Se usa ACTIN2 como el promotor que flanquea ambos laterales del gen de CBL. Para todos estos enfoques, existe la opción de usar o no usar terminadores transcripcionales en el extremo distal de los promotores. Si se usa un terminador de la transcripción, el transcrito comenzaría en el extremo 3' de un promotor, continuaría a lo largo del gen de CBL en una orientación, continuaría a través del segundo promotor del extremo 3' al extremo 5' y terminaría en el terminador transcripcional en el extremo 5' del segundo promotor. El uso de un terminador de la transcripción puede servir para estabilizar el ARN transcrito.

Ejemplo 4: Regulación de la expresión del gen de luciferasa

Construcción de una molécula de ADN quimérica que codifica fragmentos de ARN de luciferasa sentido y antisentido (construcción sentido/antisentido)

Se amplifica un fragmento orientado "sentido" de 670 pb del gen de luciferasa de luciérnaga del plásmido pLuc + (vector pGL3 de Promega, N° de acceso de GenBank U47295) a partir de ADN del plásmido pPH108 usando los cebadores oligonucleotídicos ds_Luc1 (5'-CGC GGA TCC AAG ATT CAA AGT GCG CTG CTG-3', SEC ID N° 13; sitio de restricción *Bam*HI subrayado) y ds_Luc2 (5'-GCG AAG CTT GGC GAC GTA ATC CAC GAT CTC-3', SEC ID N° 14; sitio de restricción *Hind*III subrayado). Se usa ADN polimerasa termoestable TurboPfu (Stratagene) en reacciones de 50 µl de acuerdo con el protocolo del fabricante con cinco ciclos de 95 °C/1 min, 55 °C/1,5 min, 72 °C/2 min seguido de veinticinco ciclos de 95 °C/1 min, 72 °C/3,5 min. De una manera similar un fragmento orientado "antisentido" de 669 pb del gen de luciferasa de luciérnaga del plásmido pLUC + se amplifica por PCR de ADN del plásmido pPH108 usando cebadores oligonucleotídicos ds_Luc3 (5'-CGG TCT AGA AAG ATT CAA AGT GCG CTG CTG-3', SEC ID N° 15; sitio de restricción *Xba*I subrayado) y ds_Luc2 (5'-GCG AAG CTT GGC GAC GTA ATC CAC GAT CTC-3', SEC ID N° 16; sitio de restricción *Hind*III subrayado). Los fragmentos de ADN resultantes se purifican por electroforesis a través de un gel de Tris-acetato 1 % preparado a partir de agarosa a punto de fusión bajo (FMC), seguido de extracción de fenol-cloroformo de los cortes de gel escindidos que contienen los productos de PCR. El ADN del producto sentido (ds_Luc1/2) se digiere con *Bam*HI y *Hind*III y el ADN del producto antisentido (ds_Luc3/2) se digiere con *Xba*I y *Hind*III de acuerdo con procedimientos convencionales (se obtuvieron enzimas de restricción de New England Biolabs). Los fragmentos de ADN de extremos adhesivos resultantes se purifican en gel como se ha descrito anteriormente. El fragmento *Bam*HI-*Hind*III sentido y el fragmento *Hind*III-*Xba*I antisentido se clonan después en una ligación de tres vías en el vector de clonación pLitmus28 (New England Biolabs), que se ha digerido con *Bam*HI y *Xba*I. La construcción resultante se nombra pAdF3. Un fragmento de ADN de 563 pb que contiene la fase abierta de lectura del gen *bar* (D'Halluin y col. (1992) Methods in Enzymology 216:415-426) se amplifica a partir de ADN del plásmido CSA104 usando los oligonucleótidos *bar*-1 (5'-GCG **AAG CTT** GAT CCA TGA GCC CAG AAC

GA-3', SEC ID N° 17; sitio de restricción *HindIII* en negrita) y *bar-2* (5'-GCC **AAG CTT** CCT AGA ACG CGT GAT CTC-3', SEC ID N° 18; sitio de restricción *HindIII* en negrita). Se usa ADN polimerasa termoestable Pfu (Stratagene) en reacción de 100 µl de acuerdo con el protocolo del fabricante con 25 ciclos de 94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/1 min. Después de una purificación por extracción de fenol y precipitación con etanol, el producto de PCR de *bar* se digiere con *HindIII* y se purifica en gel a través de un gel de agarosa 2 % como se ha descrito anteriormente. Se construye plásmido pAdF1 por ligación del fragmento de ADN de *bar HindIII* en el plásmido pAdF3 que se ha digerido con *HindIII*. De las dos posibles construcciones resultantes de esta clonación no direccional, pAdF1 se caracteriza por la orientación del gen *bar*, que es la misma que la del fragmento "sentido" del gen de luciferasa presente en pAdF3. Se escinde un fragmento de ADN de 1,2 kb *BamHI-SalI* que contiene el promotor ACT2 de *Arabidopsis* (An y col, (1996) Plant J. 10:107-121) de pNOV1416 (construcción preparada por Scott Rabe; NB171 pág. 122; 8-17-98) y se clona en pUC21 digerido con *BamHI* y *SalI* para generar la construcción pAct2. El promotor de ACT2 se escinde después de pAct2 por digestión con *BamHI* y *SpeI*.

Para construir vector binario pAdF4 para transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* con la construcción ds_Luc1/2/3 ARN sentido/antisentido se digiere ADN de plásmido binario pSGCHC1 que porta un gen de resistencia a kanamicina para selección bacteriana y un gen de resistencia a higromicina para selección de plantas transgénicas con *SpeI* y *SacI*. El fragmento aislado de 11,6 kb resultante de pSGCHC1 se liga en una reacción de tres vías usando ADN ligasa T4 (New England Biolabs) con fragmento *BamHI-SpeI* con promotor Act2 y el fragmento *BamHI-SacI* de pAdF3 que contiene fragmentos génicos de luciferasa tanto antisentido como sentido. De forma similar, el vector binario pAdF2 se construyó en una ligación de tres vías incluyendo el vector pSGCHC1 de 11,6 kb digerido con *SpeI* y *SacI* descrito anteriormente, el fragmento *SpeI-BamHI* que porta el promotor Act2 y el fragmento *BamHI-SacI* de pAdF1 que contiene los fragmentos de gen de luciferasa sentido y antisentido que rodean al gen *bar*.

Transformación de *Agrobacterium* e infiltración en vacío de plantas de *Arabidopsis*

Se introducen plásmidos pAdF2 y pAdF4 en *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 por electroporación y las colonias transformadas se seleccionan y amplifican. Las plantas de cuatro o cinco semanas de edad de líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* que expresan luciferasa constitutivamente (promotor UBQ3 (Norris y col (1993) PMB 21: 895-906) / UBQ3 + CaMV 35S 5' UTR/luc +; *pPH108*) o de forma inducible (promotor PR-1 de *Arabidopsis*/luc +; *pCIB200*, línea 6E) se infiltran por vacío con clones de *Agrobacterium* que portan los vectores de ADN-T binarios pAdF2 o pAdF4. Las plantas transformadas se co-seleccionan en higromicina y kanamicina y se dejan crecer en condiciones de fitotróp controladas para determinación de la actividad luciferasa. Además, la actividad luciferasa en el fondo de *pCIB200-6E* se evalúa 48 horas después de la inducción con BTH (tratamiento con BTH esencialmente como se ha descrito en Lawton y col (1996) Plant J. 10: 71-82). La actividad luciferasa se cuantifica usando un ensayo basado en luminiscencia en extractos tisulares después de la adición de sustrato de luciferina. La actividad luciferasa también se controla en la planta usando un sistema de formación de imágenes de vídeo enfriado con CCD (Hamamatsu). Obsérvese que el gen de luciferasa en *pPH108* es de pGL3 (Promega, N° de acceso de GenBank U47295); y el gen de luciferasa en *pCIB200-6E* es de pGL2 (Promega, N° de acceso de GenBank X65323). Los ensayos de luciferasa se realizan con un reactivo de ensayo de luciferasa (Promega, N° de catálogo E1501). Se muelen perforaciones de hojas en tampón de KPO₄ 0,1 M pH 7,8 a 4 °C y se centrifuga brevemente. Una alícuota del sobrenadante se mezcla con el reactivo de ensayo de luciferasa y se cuantifica la actividad luciferasa en un luminómetro Monolight 2010 (Becton Dickinson Microbiology System). Los resultados para el análisis de plantas con *pPH108* transformadas con construcciones sentido/antisentido pAdF2 y pAdF4 se presentan en la Tabla 1, así como los resultados para plantas *pCIB200-6E* transformadas con construcción sentido/antisentido pAdF4 se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1: Unidades de luz relativas para actividad luciferasa en plantas

Se ensayan diferentes plantas de la línea parental *pPH108* para determinar el nivel medio de luciferasa en diversas plantas. Esta línea no es homocigota, por lo tanto las plantas individuales que muestren los mayores niveles de luciferasa (es decir plantas 1, 2 y 3) pueden ser homocigotas.

Se analizan líneas T1 independientes de plantas transgénicas dobles *pPH108(pAdF2)*, que comprenden la construcción pAdF2 en un fondo de *pPH108* o *pPH108(pAdF4)*, que comprenden la construcción pAdF4 en un fondo de *pPH108*. Los niveles de luciferasa varían de línea a línea probablemente debido a un intervalo de niveles de expresión de la construcción sentido/antisentido. También se analizan acontecimientos T1 independientes, plantas de *Arabidopsis Columbia* de tipo silvestre transformadas con pAdF2 (*Columbia (pAdF2)*) o pAdF4 (*Columbia(pAdF4)*), como controles.

Nº de planta	pPH108	pPH108 (pAdF2)	pPH108 (pAdF4)	Columbia (pAdF2)	Columbia (pAdF4)
1	449102	108452	338274	390	425
2	381191	85301	116609	282	339
3	338480	21013	90545	231	273
4	199141	9669	81241	160	242
5	190187	8098	54457	150	226
6	137125	7349	32361	144	214
7	134421	6197	23929	133	213
8	124596	4944	18780	133	192
9	121062	4482	16637	129	179
10	121047	3975	15008	127	161
11	115430	3697	14901	127	161
12	114916	3244	13342	123	156
13	106007	3146	13111	122	156
14	104298	2516	12198	121	151
15	92455	2449	9538	118	138
16		2315	8316	107	131
17		1850	8301		
18		1689	5957		
19		1578	5110		
20		1282	4941		
21		859	4904		
22		202	4754		
23		155	4642		
24			4147		
25			3296		
26			3286		
27			2885		
28			2800		
29			2423		
30			1703		

Tabla 2: Unidades de Luz relativas para la actividad luciferasa en plantas individuales ensayadas

Se dejan crecer y se toman muestras de plántulas de la línea parental pCIB200-6E así como líneas transgénicas dobles T1 independientes pCIB200-6E(pAdF4). También se analizan *Arabidopsis columbia* de tipo silvestre de acontecimientos T1 independientes transformadas con construcción pAdF4, como controles.

5

Nº de planta	pCIB200-6E	pCIB200-6E(pAdF4)	Columbia(pAdF4)
1	17983	19990	214
2	7662	5157	217
3	6657	4753	233
4	5608	3334	263
5	3340	1370	186
6	2850	736	291
7	2461	484	239
8	2445	478	227
9	2349	476	274
10	2301	373	

Ejemplo 5: Regulación de la expresión de un gen de interés usando un sistema de recombinación específica de sitio

Se producen fragmentos de ARN sentido y antisentido usando un sistema de recombinación específico de sitio. La recombinación específica de sitio es un proceso de escisión de ADN y religación mediado por una enzima recombinasa. La recombinasa reconoce una secuencia de ADN altamente específica. Algunos sistemas de recombinación específicos de sitio usan solamente una proteína para actuar en su sitio diana. Se sabe que varios sistemas de recombinación específicos de sitio tales como Cre/lox, FLP/FRT, R/RS y Gin/gix median en los procesos de recombinación específicos de sitio en plantas (Ow y Medberry, 1995, Critical Reviews in Plant Sciences 14: 239-261). Dependiendo de la configuración de los sitios de reconocimiento de recombinasa en los sustratos de recombinación el proceso de recombinación da como resultado delección, inversión o integración de secuencias de

10

15

ADN. Una reacción particular de este tipo, es decir inversión, se describe en el presente documento. Se colocan dos sitios de reconocimiento de recombinasa en el casete de expresión génica deseable en orientaciones opuestas. El primer sitio de reconocimiento se sitúa cadena abajo del promotor en el líder no traducido o dentro de la región proximal 5' de la secuencia codificante del transgén. El segundo sitio se sitúa en la región no traducida 3' o en la región proximal 3' de la secuencia codificante del transgén en la orientación opuesta al primer sitio. La cadena codificante o no codificante de la secuencia de ADN deseada se liga operativamente a un promotor. En presencia de la recombinasa, las secuencias flanqueadas por los dos sitios de reconocimiento en orientación opuesta se invierten. Como consecuencia del procedimiento de recombinación, las cadenas tanto codificantes como no codificantes de los genes deseados se ligan operativamente al promotor y se producen transcritos tanto sentido como antisentido de los mismos loci genéticos en el mismo ambiente cromosómico y son capaces de formar moléculas de ARNbc.

La expresión constitutiva de alto nivel de recombinasa específica de sitio tal como Cre puede provocar fenotipos anómalos en algunas plantas (Que y col., 1998, Plant J. 13:401-409). Preferentemente la expresión de la recombinasa está bajo el control de un promotor inducible. En una realización, el casete de expresión de recombinasa se sitúa en el mismo vector de transformación usado para introducir las secuencias transgénicas deseadas flanqueadas por dos sitios de reconocimiento de recombinasa en orientación opuesta. En otra realización, las plantas transgénicas que contienen el transgén flanqueado por los sitios de reconocimiento de recombinasa se cruzan con líneas que expresan recombinasa o se vuelven a transformar con un vector que expresa recombinasa. En otra realización de la invención, se usa un virus de ARN o ADN recombinante que contiene el casete de expresión de recombinasa inducible para infectar plantas que contienen la construcción de transgén deseable. El virus recombinante es preferentemente defectuoso al provocar fenotipos anómalos. En las realizaciones anteriores la recombinasa provoca la inversión de la copia cromosómica de las secuencias deseadas, produciendo de este modo el ARNbc deseado.

En otra realización más, un virus de ADN de planta recombinante se usa para producir fragmentos de ARN sentido y antisentido capaces de formar un ARNbc. Típicamente los virus de ADN de planta se replican de forma epicromosómica. En una realización preferida, se introduce una construcción que contiene un casete que comprende una secuencia de ADN capaz de expresar un fragmento de ARN de un gen diana flanqueado por dos sitios de reconocimiento de recombinasa invertidos en células vegetales junto con un segundo virus recombinante que expresa una recombinasa. Como alternativa, tanto el casete de expresión de recombinasa como la secuencia de ADN flanqueada por sitios de reconocimiento invertidos se ligan en el mismo vector de ADN viral. Después de haberse introducido los vectores de ADN viral en plantas, se expresa el gen de recombinasa. La expresión del gen de recombinasa provoca la inversión de las secuencias de ADN virales flanqueadas por sitios de reconocimiento de recombinasa y da como resultado la producción de gran cantidad de ARNbc de las secuencias de ADN deseadas debido a los altos números de copias de genoma viral en la célula. Son sistemas de recombinasa preferidos Cre/lox, FLP/FRT, R/RS y Gin/gix y se sabe que median en los procesos de recombinación específicos de sitio en plantas (Ow y Medberry, 1995, Critical Reviews in Plant Sciences 14:239-261, incorporado en el presente documento por referencia).

Ejemplo 6: Requisitos para la construcción de casetes de expresión de plantas

Las secuencias génicas pretendidas para expresión en plantas transgénicas se ensamblan primero en casetes de expresión detrás de un promotor adecuado y cadena arriba de un terminador de transcripción adecuado. Todos los requisitos para construcciones de casetes de expresión de plantas se aplican a las moléculas de ADN de la presente invención y se llevan a cabo usando técnicas bien conocidas en la materia.

Selección del promotor

La selección del promotor usado en casetes de expresión determina el patrón de expresión espacial y temporal de la molécula de ADN en la planta transgénica. Los promotores seleccionados expresan molécula de ADN en tipos celulares específicos (tales como células epidérmicas de hoja, células del mesófilo, células del córtex de la raíz) o en tejidos u órganos específicos (raíces, hojas o flores, por ejemplo) y esta selección refleja la localización deseada de biosíntesis de un fragmento de ARN codificado por la molécula de ADN. Como alternativa, el promotor seleccionado puede dirigir la expresión de la molécula de ADN bajo un promotor inducido por luz u otro promotor regulado temporalmente. Una alternativa adicional es que el promotor seleccionado se regule químicamente. Esto proporciona la posibilidad de inducir la expresión de la molécula de ADN solamente cuando se desee y provocada por el tratamiento con un inductor químico.

Terminadores de la transcripción

Está disponible una diversidad de terminadores de la transcripción para su uso en casetes de expresión. Estos son responsables de la terminación de la transcripción y, preferentemente, poliadenilación correcta. Los terminadores de la transcripción apropiados y los que se sabe que actúan en plantas incluyen el terminador 35S de CaMV, el terminador *tml*, el terminador de nopalina sintasa, el terminador E9 de *rbcS* del guisante. Estos pueden usarse tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas.

Secuencias para la potenciación o regulación de la expresión

Se ha descubierto que numerosas secuencias potencian la expresión génica desde dentro de la unidad transcripcional y estas secuencias pueden usarse junto con la molécula de ADN de la presente invención para aumentar su expresión en plantas transgénicas.

- 5 Se ha mostrado que diversas secuencias de intrones potencian la expresión, particularmente en células de monocotiledóneas. Por ejemplo, se ha descubierto que los intrones del gen *Adh1* de maíz potencian significativamente la expresión del gen de tipo silvestre bajo su promotor afin cuando se introducen en células de maíz. Se ha descubierto que el intrón 1 es particularmente eficaz y potencia la expresión en construcciones de fusión con el gen de cloranfenicol acetiltransferasa (Callis y col., Genes Develop 1:1183-1200 (1987)). En el mismo sistema experimental, el intrón del gen *bronze1* de maíz tuvo un efecto similar en la potenciación de la expresión (Callis y col., mencionado anteriormente). Se han incorporado de forma rutinaria secuencias intrónicas en vectores de transformación de plantas, típicamente dentro del líder no traducido.

- 15 También se sabe que varias secuencias líder no traducidas derivadas de virus potencian la expresión y estas son particularmente eficaces en células de dicotiledóneas. Específicamente, se ha mostrado que las secuencias líder del Virus del Mosaico del Tabaco (TMV, "secuencia Ω "), Virus del Mosaico Clorótico del Maíz (MCMV) y Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV) son eficaces en la potenciación de la expresión (por ejemplo Gallie y col. Nucl. Acids Res. 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski y col. Plant Molec. Biol. 15: 65-79 (1990)).

Ejemplo 7: Ejemplos de construcción de un casete de expresión

- 20 La presente invención abarca la expresión de una molécula de ADN de la presente invención bajo la regulación de cualquier promotor que sea expresable en plantas, independientemente del origen del promotor. Por lo tanto, la molécula de ADN se inserta en cualquiera de los casetes de expresión usando técnicas bien conocidas en la materia. Estos casetes de expresión pueden después transferirse fácilmente a los vectores de transformación de plantas descritos posteriormente. Además, la invención también abarca el uso de cualquier promotor expresable en plantas junto con cualquier secuencia adicional requerida o seleccionada para la expresión de la molécula de ADN. Tales secuencias incluyen, pero sin restricción, terminadores de la transcripción, secuencias ajenas para potenciar la expresión (tales como intrones [por ejemplo intrón de *Adh 1*], secuencias virales [por ejemplo TMV- Ω]).

Expresión constitutiva: el promotor 35S de CaMV

- 30 La construcción del plásmido pCGN1761 se describe en la Solicitud de Patente Publicada EP 0 392 225. pCGN1761 contiene el promotor 35S "doble" y el terminador de la transcripción *tml* con un sitio *EcoRI* único entre el promotor y el terminador y tiene una cadena principal de tipo pUC. Se construye un derivado de pCGN1761 que tiene un poliligador modificado que incluye sitios *NotI* y *XhoI* además del sitio *EcoRI* existente. Este derivado se designa pCGN1761ENX. pCGN1761ENX es útil para la clonación de secuencias de ADNc o secuencias génicas (incluyendo secuencias de ORF microbianas) dentro de su poliligador para los fines de su expresión bajo el control del promotor 35S en plantas transgénicas. El casete de promotor 35S-secuencia génica-terminador *tml* completo de una construcción tal puede escindir-se por sitios *HindIII*, *SphI*, *Sall*, y *XbaI* 5' del promotor y sitios *XbaI*, *BamHI* y *BglI* 3' del terminador para transferencia a vectores de transformación. Además, el fragmento del promotor 35S doble puede retirarse por escisión en 5' con *HindIII*, *SphI*, *Sall*, *XbaI*, o *PstI* y escisión 3' con cualquiera de los sitios de restricción del poliligador (*EcoRI*, *NotI* o *XhoI*) para reemplazo con otro promotor.

- 40 En consecuencia, se inserta una molécula de ADN de la presente invención en pCGN1761ENX para expresión constitutiva bajo el control del promotor 35S de CaMV.

Expresión bajo un promotor químicamente regulable

- 45 Esta sección describe el reemplazo del promotor 35S doble en pCGN1761 ENX con cualquier promotor de selección; como ejemplo se describe el promotor PR-1 a regulado químicamente. El promotor de selección se escinde preferentemente de su fuente por enzimas de restricción, pero puede como alternativa amplificarse por PCR usando cebadores que porten sitios de restricción terminal apropiados. Si hubiera que realizar amplificación por PCR, entonces el promotor debería volver a secuenciarse para comprobar con respecto a errores de amplificación después de la clonación del promotor amplificado en el vector diana. El promotor PR-1 a del tabaco regulable químicamente se escinde del plásmido pCIB1004 (véase documento EP 0 332 104) y se transfiere al plásmido pCGN1761ENX. pCIB1004 se escinde con *NcoI* y el saliente 3' resultante del fragmento linealizado se hace como por tratamiento con ADN polimerasa T4. El fragmento se escinde después con *HindIII* y el fragmento que contiene promotor PR-1 a resultante se purifica en gel y se clona en pCGN1761 ENX del que se ha retirado el promotor 35S doble. Esto se realiza por escisión con *XhoI* y formación de extremos romos con polimerasa T4, seguido de escisión con *HindIII* y aislamiento del terminador de vector mayor que contiene fragmento en el que se clona el fragmento de promotor de pCIB1004. Esto genera un derivado de pCGN1761ENX con el promotor PR-1a y el terminador *tml* y un poliligador intermedio con sitios *EcoRI* y *NotI* únicos.

Se inserta una molécula de ADN de la presente invención en este vector y el producto de fusión (es decir promotor-gen-terminador) se transfiere posteriormente a cualquier vector de transformación seleccionado, incluyendo los

descritos en la presente solicitud, proporcionando de este modo expresión inducible químicamente de la molécula de ADN.

Expresión constitutiva: el promotor de Actina

5 Se sabe que varias isoformas de actina se expresan en la mayoría de los tipos celulares y en consecuencia el promotor de actina es una buena selección para un promotor constitutivo. En particular, el promotor del gen *Act1* de arroz se ha clonado y caracterizado (McElroy y col. *Plant Cell* 2: 163-171 (1990)). Se ha descubierto que un fragmento de 1,3 kb del promotor contiene todos los elementos reguladores requeridos para la expresión en protoplastos de arroz. Además, se han construido numerosos vectores de expresión basados en el promotor de *Act1* específicamente para su uso en monocotiledóneas (McElroy y col. *Mol. Gen. Genet.* 231:150-160 (1991)). Estos incorporan el intrón 1 de *Act1*, secuencia flanqueante de *Adhl 5'* y el intrón 1 de *Adhl 1* (del gen de alcohol deshidrogenasa del maíz) y secuencia de promotor 35S de CaMV. Los vectores que muestran la expresión mayor son fusiones de 35S y el intrón de *Act1* o la secuencia flanqueante de *Act1 5'* y el intrón de *Act1*. Los casetes de expresión de promotor descritos por McElroy y col. (*Mol. Gen. Genet.* 231: 150-160 (1991)) se modifican fácilmente para la expresión de una molécula de ADN de la presente invención y son particularmente adecuados para su uso en huéspedes monocotiledóneos. Por ejemplo, se retiran fragmentos que contienen promotor de las construcciones de McElroy y se usan para reemplazar el promotor 35S doble en pCGN1761 ENX, que está después disponible para la inserción de secuencias génicas específicas. Los genes de fusión construidos de este modo se transfieren a vectores de transformación apropiados. En un informe separado también se ha descubierto que el promotor de *Act1* de arroz con su primer intrón dirige alta expresión en células de cebada cultivadas (Chibbar y col. *Plant Cell Rep.* 12: 506-509 (1993)). Se inserta una molécula de ADN de la presente invención cadena debajo de dicho promotor y los productos de fusión (es decir promotor-gen-terminador) se transfieren posteriormente a cualquier vector de transformación seleccionado, incluyendo los descritos en la presente solicitud.

Expresión constitutiva: el promotor de Ubiquitina

25 La ubiquitina es otro producto génico que se sabe que se acumula en muchos tipos celulares y su promotor se ha clonado de varias especies para su uso en plantas transgénicas (por ejemplo girasol, Binet y col. *Plant Science* 79: 87-94 (1991), maíz, Christensen y col. *Plant Molec. Biol.* 12: 619-632 (1989)). El promotor de ubiquitina de maíz se ha desarrollado en sistemas monocotiledóneos transgénicos y su secuencia y vectores construidos para la transformación de monocotiledóneas se desvelan en la Publicación de Patente EP 0 342 926. Además, Taylor y col. (*Plant Cell Rep.* 12: 491-495 (1993)) describen un vector (pAHC25) que comprende el promotor y primer intrón de ubiquitina de maíz y su alta actividad en suspensiones celulares de numerosas monocotiledóneas cuando se introducen mediante bombardeo de microproyectiles. El promotor de ubiquitina es claramente adecuado para la expresión de una molécula de ADN de la presente invención en plantas transgénicas, especialmente monocotiledóneas. Son vectores adecuados derivados de pAHC25 o cualquiera de los vectores de transformación descritos en la presente solicitud, modificados por la introducción de las secuencias del promotor y/o intrón de ubiquitina apropiadas.

35 Se inserta por lo tanto una molécula de ADN de la presente invención en cualquiera de estos vectores y los productos de fusión (es decir promotor-gen-terminador) se usan para transformación de plantas, dando como resultado expresión constitutiva de la molécula de ADN.

Expresión específica de raíz

40 Un patrón preferido de la expresión para una molécula de ADN de la presente invención es expresión en raíz. La expresión de la secuencia de nucleótidos solamente en tejido de raíz tiene la ventaja de alterar la expresión de un gen diana solamente en las raíces, sin una alteración conjunta de su expresión en tejido de hoja y flor y semillas. Un promotor de raíz adecuado es el descrito por de Framond (*FEBS* 290: 103-106 (1991)) y también en la Solicitud de Patente Publicada EP 0 452 269. Este promotor se transfiere a un vector adecuado tal como pCGN1761 ENX y la molécula de ADN se inserta en tal vector. El casete promotor-gen-terminador completo se transfiere posteriormente a un vector de transformación de interés.

Promotores inducibles por lesión

50 Se han descrito numerosos promotores tales (por ejemplo Xu y col. *Plant Molec. Biol.* 22: 573-588 (1993), Logemann y col. *Plant Cell* 1: 151-158 (1989), Rohrmeier & Lehle, *Plant Molec. Biol.* 22: 783-792 (1993), Firek y col. *Plant Molec. Biol.* 22: 129-142 (1993), Warner y col. *Plant J.* 3: 191-201 (1993)) y todos son adecuados para su uso con la presente invención. Logemann y col. (mencionado anteriormente) describen las secuencias cadena arriba 5' del gen *wun1* de patata dicotiledónea. Xu y col. (mencionado anteriormente) muestran que un promotor inducible por lesión de la patata dicotiledónea (*pin2*) está activo en el arroz monocotiledóneo. Además, Rohrmeier & Lehle (mencionado anteriormente) describe la clonación del ADNc de *Wip1* del maíz que se induce por lesión y que puede usarse para aislar el promotor afin usando técnicas convencionales. De forma similar, Firek y col. (mencionado anteriormente) y Warner y col. (mencionado anteriormente) han descrito un gen inducido por lesión de la monocotiledónea *Asparagus officinalis* que se expresa en lesión local y sitios de invasión de patógenos. Usando técnicas de clonación bien conocidas en la materia, estos promotores pueden transferirse a vectores adecuados, fusionarse con una molécula

de ADN de la presente invención y usarse para expresar estos genes en los sitios de infección de plagas de insectos.

Expresión preferida en la médula

5 La Solicitud de Patente WO 93/07278 describe el aislamiento del gen *trpA* del maíz que se expresa preferentemente en células de la médula. Usando técnicas de biología molecular convencionales, este promotor, o partes del mismo, puede transferirse a un vector tal como pCGN1761 en el que puede reemplazar el promotor 35S y puede usarse para dirigir la expresión de una molécula de ADN de la presente invención de una manera preferida para médula. De hecho, se transfieren fragmentos que contienen el promotor con preferencia para médula o partes de los mismos a cualquier vector y se modifican para su utilidad en plantas transgénicas. La expresión con preferencia para médula de la molécula de ADN se consigue insertando la molécula de ADN en tal vector.

Expresión específica en polen

15 La Solicitud de Patente WO 93/07278 describe adicionalmente el aislamiento del gen de proteína quinasa dependiente de calcio de maíz (CDPK) que se expresa en células de polen. La secuencia génica y promotor se extienden hasta 1.400 pb desde el comienzo de la transcripción. Usando técnicas de biología molecular convencionales, este promotor o partes del mismo se transfieren a un vector tal como pCGN1761 en el que reemplaza el promotor 35S y se usa para dirigir la expresión de una molécula de ADN de la presente invención de una manera específica de polen. De hecho pueden transferirse fragmentos que contienen el promotor específico de polen o partes del mismo a cualquier vector y modificarse para su utilidad en plantas transgénicas.

Expresión Específica de Hoja

20 Se ha descrito un gen de maíz que codifica fosfoenol carboxidasa (PEPC) por Hudspeth & Grula (Plant Molec Biol 12: 579-589 (1989)). Usando técnicas de biología molecular convencionales el promotor para este gen se usa para dirigir la expresión de una molécula de ADN de la presente invención de una manera específica de hoja en plantas transgénicas.

Ejemplo 8: Construcción de vectores de transformación de plantas

25 Están disponibles numerosos vectores de transformación para transformación de plantas y se inserta una molécula de ADN de la presente invención en cualquiera de los casetes de expresión descritos anteriormente, de modo que sean capaces de expresar la molécula de ADN en células deseables, en condiciones apropiadas. Se incorpora después un casete de expresión que contenga la secuencia de nucleótidos en cualquier vector de transformación descrito posteriormente.

30 La selección de vector para su uso dependerá de la técnica de transformación preferida y la especie diana para transformación. Para ciertas especies diana, pueden preferirse diferentes marcadores de selección, antibióticos o herbicidas. Los marcadores de selección usados habitualmente en transformación incluyen el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina y antibióticos relacionados (Messing & Vierra, Gene 19: 259-268 (1982); Bevan y col., Nature 304:184-187 (1983)), el gen *bar* que confiere resistencia al herbicida fosfinotricina (White y col., Nucl Acids Res 18: 1062 (1990), Spencer y col. Theor Appl Genet 79: 625-631 (1990)), el gen *hph* que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Blochinger & Diggelmann, Mol Cell Biol 4: 2929-2931) y el gen *dhfr* que confiere resistencia a metotrexato (Bourouis y col, EMBO J. 2(7):1099-1104 (1983)).

(1) Construcción de Vectores Adecuados para Transformación de *Agrobacterium*

40 Muchos vectores están disponibles para transformación usando *Agrobacterium tumefaciens*. Estos portan típicamente al menos una secuencia límite de ADN-T e incluyen vectores tales como pBIN19 (Bevan, Nucl. Acids Res. (1984). A continuación se describe la construcción de dos vectores típicos.

Construcción de pCIB200 y pCIB2001

45 Los vectores binarios pCIB200 y pCIB2001 se usan para la construcción de vectores recombinantes para su uso con *Agrobacterium* y se construye de la siguiente manera. Se crea pTJS75kan por digestión con *NarI* de pTJS75 (Schmidhauser y Helinski, J Bacteriol. 164: 446-455 (1985)) permitiendo la escisión del gen de resistencia a tetraciclina, seguido de inserción de un fragmento *AccI* de pUC4K que porta un NPTII (Messing y Vierra, Gene 19: 259- 268 (1982), Bevan y col, Nature 304: 184-187 (1983), McBride y col, Plant Molecular Biology 14: 266-276 (1990)). Se ligan engarces de *XhoI* con el fragmento de *EcoRV* de pCIB7 que contiene los extremos de ADN-T derecho e izquierdo, un gen quimérico *nos/nptII* seleccionable de plantas y el poli-ligador pUC (Rothstein y col, Gene 53: 153-161 (1987)), y el fragmento digerido con *XhoI* se clona en pTJS75kan digerido con *Sall* para crear pCIB200 (véase también el documento EP 0 332 104). pCIB200 contiene los siguientes sitios de restricción de poli-ligadores únicos: *EcoRI*, *SstI*, *KpnI*, *BglII*, *XbaI* y *SAlI*. pCIB2001 es un derivado de pCIB200 que se crea por la inserción en el poli-ligador de sitios de restricción adicionales. Son sitios de restricción únicos en el poli-ligador de pCIB2001 *EcoRI*, *SstI*, *KpnI*, *BglII*, *XbaI*, *Sall*, *MluI*, *BclI*, *AvrII*, *Apal*, *HpaI* y *StuI*. pCIB2001, además de contener estos sitios de restricción únicos también tiene selección de kanamicina vegetal y bacteriana, los extremos de ADN-T izquierdo y

derecho para transformación medida por *Agrobacterium*, la función *trfA* derivada de RK2 para movilización entre *E. coli* y otros huéspedes y las funciones *OriT* y *OriV* también de RK2. El poli-ligador de pCIB2001 es adecuado para la clonación de casetes de expresión de plantas que contienen sus propias señales reguladoras.

- 5 Se inserta uno cualquiera de los casetes de expresión de plantas descritos anteriormente y que comprenden una molécula de ADN de la presente invención en pCIB2001, preferentemente usando el poli-ligador.

Construcción de pCIB10 y derivados de selección de higromicina de la misma

10 El vector binario pCIB10 contiene un gen que codifica resistencia a kanamicina para selección en plantas, las secuencias de los extremos derecho e izquierdo de ADN-T e incorpora secuencias del plásmido de amplia gama de huéspedes pRK252 permitiendo que se replique tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*. Su construcción se describe por Rothstein y col. (Gene 53: 153-161 (1987)). Se han construido diversos derivados de pCIB10 que incorporan el gen para higromicina B fosfotransferasa descrito por Gritz y col (Gene 25: 179-188 (1983)). Estos derivados permiten la selección de células vegetales transgénicas en higromicina solamente (pCIB743), o higromicina y kanamicina (pCIB715, pCIB717). Estos vectores se usan para transformar un casete de expresión que comprende una molécula de ADN de la presente invención.

- 15 (2) Construcción de vectores adecuados para transformación sin *Agrobacterium*.

20 La transformación sin el uso de *Agrobacterium tumefaciens* evita el requisito de secuencias de ADN-T en el vector de transformación seleccionado y en consecuencia pueden utilizarse vectores sin estas secuencias además de vectores tales como los descritos anteriormente que contienen secuencias de ADN-T. Las técnicas de transformación que no se basan en *Agrobacterium* incluyen transformación mediante bombardeo de partículas, captación de protoplastos (por ejemplo PEG y electroporación), microinyección o transformación de polen (Patente de Estados Unidos 5.629.183).

La selección del vector depende en gran medida de la selección preferida de las especies a transformar. A continuación, se describe la construcción de algunos vectores típicos.

Construcción de pCIB3064

25 pCIB3064 es un vector derivado de pUC adecuado para técnicas de transferencia génica directa en combinación con selección por el herbicida Basta (o fosfotricina). El plásmido pCIB246 comprende el promotor 35S de CaMV en fusión operativa con el gen GUS de *E. coli* y el terminador de la transcripción 35S de CaMV y se describe en la solicitud publicada de PCT WO 93/07278. El promotor 35S de este vector contiene dos secuencias ATG 5' del sitio de comienzo. Estos sitios se mutan usando técnicas de PCR convencionales de tal modo que se retiren las ATG y generen los sitios de restricción *SspI* y *PvuII*. Los nuevos sitios de restricción están a 96 y 37 pb del sitio *Sall* único y 101 y 42 pb del sitio de comienzo real. El derivado resultante de pCIB246 se designa pCIB3025. El gen GUS se escinde después de pCIB3025 por digestión con *Sall* y *SacI*, los extremos terminales se hacen romos y se vuelven a ligar para generar el plásmido pCIB3060. El plásmido pJIT82 se obtiene del centro John Innes, Norwich y el fragmento *SmaI* de 400 pb que contiene el gen *bar* de *Streptomyces viridochromogenes* se escinde e inserta en el sitio *HpaI* de pCIB3060 (Thompson y col. EMBO J 6: 2519-2523 (1987)). Esto genera pCIB3064 que comprende el gen *bar* bajo el control del promotor 35S de CaMV y terminador para selección de herbicida, un gen para resistencia a ampicilina (para selección en *E. coli*) y un poli-ligador con los sitios únicos *SphI*, *PstI*, *HindIII* y *BamHI*. Este vector es adecuado para la clonación de casetes de expresión de plantas que contienen sus propias señales reguladoras para dirigir la expresión de una molécula de ADN de la presente invención.

- 40 Construcción de pSOG19 y pSOG35

45 pSOG35 es un vector de transformación que utiliza el gen de *E. coli* dihidrofolato reductasa (DHFR) como un marcador seleccionable que confiere resistencia a metotrexato. La PCR se usa para amplificar el promotor 35S (~ 800 pb), intrón 6 del gen *Adh1* de maíz (~ 550 pb) y 18 pb de la secuencia líder no traducida de GUS de pSOG10. También se amplifica un fragmento de 250 pb que codifica el gen de dihidrofolato reductasa de tipo II de *E. coli* por PCR y estos dos fragmentos de PCR se ensamblan con un fragmento *SacI-PstI* de pBI221 (Clontech), que comprendía la cadena principal del vector pUC19 y el terminador de nopalina sintasa. El ensamblaje de estos fragmentos generó pSOG19 que contiene el promotor 35S en fusión con la secuencia del intrón 6, el líder de GUS, el gen de DHFR y el terminador de nopalina sintasa. El reemplazo del líder de GUS en pSOG19 con la secuencia líder del virus del mosaico clorótico del maíz (MCMV) generó el vector pSOG35. pSOG19 y pSOG35 portan el gen pUC para resistencia a ampicilina y tienen sitios *HindIII*, *SphI*, *PstI* y *EcoRI* disponibles para la clonación de secuencias ajenas, en particular, una molécula de ADN de la presente invención.

Ejemplo 9: Transformación de cloroplastos

Vectores de transformación

55 Para expresión de una molécula de ADN de la presente invención en plastidios vegetales, se usa el vector de transformación de plastidios pPH143 (documento WO 97/32011, ejemplo 36). La molécula de ADN se inserta en

pPH143 reemplazando de este modo la secuencia codificante PROTOX. Este vector se usa después para transformación de plastidios y selección de transformantes para resistencia a espectinomicina. Como alternativa, la molécula de ADN se inserta en pPH143 de modo que reemplaza el gen *aadH*. En este caso, se seleccionan transformantes con respecto a resistencia a inhibidores de PROTOX.

5 Transformación de cloroplastos

Se germinaron siete semillas de *Nicotiana tabacum* c.v. "Xanthi nc" por placa en una serie circular de 2,54 cm en medio de agar T y se bombardearon 12-14 días después de la siembra con partículas de tungsteno de 1 μm (M10, Biorad, Hercules, CA), revestidas con ADN de los plásmidos pPH143 y pPH145 esencialmente como se ha descrito (Svab, Z. y Maliga, P. (1993) PNAS 90, 913-917). Las plántulas bombardeadas se incubaron en medio T durante dos días después de lo cual se escindieron las hojas y se situaron con el lado abaxial hacia arriba en luz brillante (350-500 μmoles de fotones/m²/segundo) en placas de medio RMOP (Svab, Z., Hajdukiewicz, P. y Maliga, P. (1990) PNAS 87, 8526-8530) que contenía dihidrocloruro de espectinomicina 500 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, St. Louis, MO). Los brotes resistentes que aparecían por debajo de las hojas blanqueadas de tres a ocho semanas después del bombardeo se subclonaron en el mismo medio selectivo, se permitió que formaran callos y los brotes secundarios se aislaron y se subclonaron. La segregación completa de copias genómicas de plastidios transformados (homoplasmicidad) en subclones independientes se evaluó por técnicas convencionales de transferencia de Southern (Sambrook y col, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor). Se separó ADN celular total digerido con *BamHI* / *EcoRI* (Mettler, I. J. (1987) Plant Mol Biol Reporter 5, 346-349) en geles de agarosa de Tris-borato (TBE) 1 %, se transfirieron a membranas de nylon (Amersham) y se exploraron con secuencias de ADN con cebadores aleatorios marcadas con ³²P correspondientes a un fragmento de ADN *BamHI* / *HindIII* de 0,7 kb de pC8 que contenía una parte de la secuencia de dirección a plastidios *rps7/12*. Los brotes homoplásmicos se enraizan de forma aséptica en medio MS/IBA que contiene espectinomicina (McBride, KE y col. (1994) PNAS 91, 7301-7305) y se transfieren al invernadero.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Syngenta Participations AG

5 <120> Regulación mediada por DSRNA de expresión génica en plantas

<130> S-30496/EP DIV

<150> US 09/084.942

10 <151> 26-05-1998

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.1

15 <210> 1

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 1

25 cgcgatcct ggaagacgcc aaaaaca 27

<210> 2

<211> 38

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido

35 <400> 2

cggaagctta ggctgccta atcgcagtat ccggaatg 38

<210> 3

<211> 28

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido

45 <400> 3

cgtctagag gaagacgcca aaaacata 28

<210> 4

50 <211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> oligonucleótido

<400> 4

cggaagctta ggctgccta atcgcagtat ccggaatg 38

60 <210> 5

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 5
 gtacctcgag tctagactcg ag 22
 5
 <210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 6
 gatcgagctc cagagaact gtctccg 27
 15
 <210> 7
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 7
 tcagccatgg gaagacaagt acattgc 27
 25
 <210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 8
 ctggccatgg cagagaact gtctccg 27
 35
 <210> 9
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 9
 catggagctc gaagacaagt acattgca 28
 45
 <210> 10
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 10
 catcgagctc ctctgtttaa accacagagaa ctgtctccgt cgc 43
 60
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido
 5 <400> 11
 tttggagagg acagacctgc 20

 <210> 12
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 15 <400> 12
 ggatttgggt ttaggaatt agaa 24

 <210> 13
 <211> 30
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 13
 cgcgatcca agattcaaag tgcgctgctg 30

 <210> 14
 <211> 30
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 14
 gcgaaagcttg gcgacgtaat ccacgatctc 30
 40
 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 15
 50 cggctagaa agattcaaag tgcgctgctg 30

 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 60 <400> 16
 gcgaaagcttg gcgacgtaat ccacgatctc 30

 <210> 17
 <211> 29

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 17
gccaagcttg atccatgagc ccagaacga 29

10 <210> 18
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 18
gccaagcttc ctagaacgcg tgatctc 27

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para reducir la expresión de un gen diana en una célula vegetal que comprende introducir en la célula vegetal una primera secuencia de ADN capaz de expresar un fragmento de ARN sentido de un gen diana y una segunda secuencia de ADN capaz de expresar un fragmento de ARN antisentido de dicho gen diana, en el que dichas primera y segunda secuencias de ADN están comprendidas en una molécula de ADN, en el que dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido son capaces de formar una molécula de ARN bicatenaria, en el que dicha molécula de ADN comprende adicionalmente una secuencia de ADN que comprende un engarce que comprende señales de procesamiento de intrones entre dicha primera y segunda secuencias de ADN, en el que la expresión de dicho gen diana en dicha célula vegetal se reduce cuando dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido se expresan de dichas primera y segunda secuencias de ADN y dichos fragmentos de ARN forman una molécula de ARN bicatenaria.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha molécula de ADN que comprende dicha primera y dicha segunda secuencias de ADN se introduce en dicha célula vegetal por un vector de transformación de plantas.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho vector de transformación de plantas comprende adicionalmente un gen marcador seleccionable, opcionalmente en el que dicho gen marcador seleccionable es EPSPS o DHFR.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho gen diana es un gen esencial de dicha célula vegetal.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho gen diana es un gen heterólogo, preferentemente integrado de forma estable en el genoma de dicha célula vegetal.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que la molécula de ARN bicatenaria tiene una longitud de 50 nucleótidos o más.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que dichas secuencias de ADN que codifican dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido están ligados operativamente a un promotor, preferentemente en el que dicho promotor es el promotor nativo de un gen diana nativo, un promotor heterólogo, un promotor constitutivo, un promotor inducible, por ejemplo, un promotor inducible por lesión, un promotor específico de tejido o un promotor regulado por el desarrollo.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicha molécula de ADN que comprende dicha primera y dicha segunda secuencias de ADN se integra de forma estable en el genoma de la célula vegetal.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada** adicionalmente **por** las características de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.
10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 en el que dicha molécula de ADN que comprende dicha primera y dicha segunda secuencias de ADN se integra de forma estable en el genoma de la célula vegetal y en el que dicho gen marcador seleccionable se integra también de forma estable en el genoma de la célula vegetal.
11. Una célula vegetal que comprende una primera secuencia de ADN capaz de expresar un fragmento de ARN sentido de un gen diana y una segunda secuencia de ADN capaz de expresar un fragmento de ARN antisentido de dicho gen diana, siendo dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido capaces de formar una molécula de ARN bicatenaria, estando comprendidas dicha primera y segundas secuencias de ADN en una molécula de ADN, que se integra de forma estable en el genoma de dicha célula vegetal, comprendiendo dicha célula vegetal además una secuencia de ADN que comprende un engarce que comprende señales de procesamiento de intrones entre dicha primera secuencia de ADN y dicha segunda secuencia de ADN, reduciéndose la expresión de dicho gen diana en dicha célula vegetal cuando dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido se expresan de dicha primera y segunda secuencias de ADN y dichos fragmentos de ARN forman una molécula de ARN bicatenaria.
12. Una célula vegetal de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicha célula vegetal comprende adicionalmente un gen marcador seleccionable que se integra de forma estable en el genoma de dicha célula vegetal, opcionalmente siendo dicho gen marcador seleccionable DHFR o EPSPS.
13. Una célula vegetal de acuerdo con la reivindicación 11 o reivindicación 12, **caracterizada** adicionalmente **por** las características de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.
14. Una planta que comprende una célula vegetal de acuerdo con la reivindicación 12 o reivindicación 13; o la descendencia de dicha planta comprendiendo dicha descendencia una célula vegetal de acuerdo con las reivindicaciones 12 ó 13.
15. Una semilla que comprende una célula vegetal de acuerdo con la reivindicación 12 o reivindicación 13.

- 5 16. Un vector de transformación de plantas para su uso en la reducción de la expresión de un gen diana en una célula vegetal, comprendiendo dicha transformación de plantas una primera secuencia de ADN capaz de expresar un fragmento de ARN sentido de un gen diana y una segunda secuencia de ADN capaz de expresar un fragmento de ARN antisentido de dicho gen diana, siendo capaces dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido de formar una molécula de ARN bicatenaria, comprendiendo dicho vector de transformación de plantas adicionalmente una secuencia de ADN que comprende un engarce que comprende señales de procesamiento de intrones entre dicha primera secuencia de ADN que codifica dicho fragmento de ARN sentido y dicha segunda secuencia de ADN que codifica dicho fragmento de ARN antisentido.
- 10 17. El vector de transformación de plantas de la reivindicación 16 que comprende adicionalmente un gen marcador seleccionable, opcionalmente siendo dicho marcador seleccionable EPSPS o DHFR.
18. El vector de transformación de plantas de la reivindicación 16 o reivindicación 17, **caracterizado** adicionalmente **por** las características de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.
- 15 19. El uso de un vector de transformación de plantas de cualquiera de las reivindicaciones 16, 17 ó 18 en la reducción de la expresión de un gen diana en una célula vegetal; en el que la expresión de dicho gen diana en dicha célula vegetal se reduce cuando dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido se expresan de dichas primera y segunda secuencias de ADN y dichos fragmentos de ARN forman una molécula de ARN bicatenaria.
20. Un procedimiento para producir una planta transformada genéticamente que comprende las etapas de:
- 20 i) introducir en una célula vegetal una primera secuencia de ADN capaz de expresar un fragmento de ARN sentido de un gen diana y una segunda secuencia de ADN capaz de expresar un fragmento de ARN antisentido de dicho gen diana, estando comprendidas dicha primera y segunda secuencias de ADN en una molécula de ADN, siendo capaces dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido de formar una molécula de ARN bicatenaria, comprendiendo dicha molécula de ADN un engarce que comprende señales de procesamiento de intrones entre ADN que codifican dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido, introduciéndose dicha molécula de ADN que comprende dicha primera y segunda secuencias de ADN en dicha célula vegetal por un vector de transformación de plantas, comprendiendo dicho vector adicionalmente un gen marcador seleccionable, opcionalmente DHFR o EPSPS; y seleccionándose una célula vegetal en la que dicha molécula de ADN y dicho gen marcador seleccionable están integrados de forma estable en el genoma de la célula vegetal y reduciéndose la expresión de dicho gen diana en dicha célula vegetal cuando dichos fragmentos de ARN sentido y antisentido se expresan de dichas primera y
- 25 segunda secuencias de ADN y dichos fragmentos de ARN forman una molécula de ARN bicatenaria; y
- 30 ii) regenerar una planta transformada genéticamente que comprende dicha molécula de ADN y dicho gen marcador seleccionable.
21. El procedimiento de la reivindicación 20 **caracterizado** adicionalmente **por** las características de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.