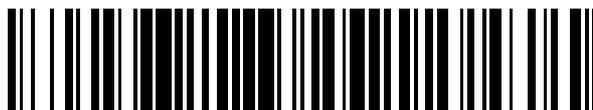


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 136**

51 Int. Cl.:

A01H 3/00 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2008 E 08021358 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2012 EP 2198700**

54 Título: **Método para la producción de una planta sin transgenes con un patrón de metilación alterado**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2013

73 Titular/es:

**RLP AGROSCIENCE GMBH (100.0%)
Breitenweg 71
67435 Neustadt/Weinstrasse, DE**

72 Inventor/es:

**WASSENEGGER, MICHAEL, DR. HABIL.;
KRCZAL, GABRIELE, DR. PROF. y
DALAKOURAS, ATHANASIOS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 398 136 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

Método para la producción de una planta sin transgenes con un patrón de metilación alterado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a materiales y métodos para la producción de una planta sin transgenes que presenta patrones de metilación alterados. Ciertas formas de realización de la invención proporcionan métodos, ácidos nucleicos, vectores, células vegetales, plantas y equipos adecuados para producir una planta carente de todo material transgénico, y por tanto sin transgenes, pero que presenta un patrón de metilación de DNA alterado. La presente invención está relacionada además con métodos, ácidos nucleicos, vectores, células vegetales, plantas y equipos para la producción de una planta sin transgenes cuyo patrón de metilación alterado posibilita la expresión diferencial de un gen. Por último, la presente invención también abarca un método para modificar el patrón de metilación de una secuencia diana de DNA en una célula vegetal.

Descripción

15 Hasta la fecha, la generación de organismos genéticamente modificados (OGM), en particular plantas, se lleva a cabo normalmente bien mediante la inserción estable de una secuencia de nucleótidos exógena en el genoma del organismo, bien mediante la inactivación génica (*knock-out*) o la reducción de la expresión génica (*knock-down*) dirigida de una parte del genoma, p. ej. por recombinación homóloga o técnicas con RNA de interferencia. Sin embargo, estas estrategias provocan cambios heredables en la secuencia de DNA del genoma diana. En la mayor parte de casos, sobre todo en lo referente a la introducción de resistencia a antibióticos por métodos genéticos, el cultivo de tales plantas modificadas suscita una gran controversia entre el público, y su liberación en el medio ambiente permanece sometida a normativas y evaluaciones de riesgo muy estrictas en la Unión Europea y en muchos otros países. Esta situación explica el reducido número de plantas modificadas con técnicas de ingeniería genética y de productos derivados de las mismas que se comercializan actualmente en el mercado europeo. Lo mismo puede decirse de los mecanismos de silenciamiento génico basados en RNA, principalmente la silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, por sus siglas en inglés) o la metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM, por sus siglas en inglés), procesos que hasta ahora requieren de la presencia permanente de un constructo transgénico para mantener el efecto silenciador del gen en la planta de interés.

20 La WO 02/101059 se refiere a plantas o células vegetales transgénicas que tienen alterada la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo del almidón. Los métodos descritos conciernen a constructos transgénicos que codifican especies de RNA utilizables para el silenciamiento dirigido de los genes que codifican dichas proteínas. No obstante, las susodichas restricciones impuestas al cultivo de OGM son igualmente aplicables a las plantas transgénicas descritas por esta invención.

30 A la vista de lo anterior, la presente invención tiene por objeto proporcionar métodos y/o materiales que permitan la modificación dirigida de rasgos heredables de una planta, como la expresión génica, pero en los cuales la secuencia del genoma de la planta queda exenta de cualquier cambio en los nucleótidos, eludiendo así los diversos problemas e inconvenientes vinculados al cultivo de las plantas genéticamente modificadas.

35 En un aspecto de la presente invención, este propósito se resuelve con un método para modificar el patrón de metilación de una secuencia diana de DNA de una célula vegetal que comprende los siguientes pasos: a) proporcionar un polinucleótido adecuado para la inducción de la metilación de DNA dirigida por RNA en dicha célula vegetal, comprendiendo dicho polinucleótido una secuencia que es complementaria a la dicha secuencia diana de DNA de dicha célula vegetal; b) introducción de dicho polinucleótido en dicha célula vegetal; c) expresión de dicho polinucleótido en dicha célula transformada, induciendo así la metilación de DNA dirigida por RNA; y d) determinar el patrón de metilación de dicha secuencia diana de DNA en dichas células transformadas de la planta.

45 Otro aspecto preferido se refiere a un método para producir una planta sin transgenes que presente un patrón de metilación alterado en una secuencia diana de DNA. Tal y como se describe en la presente memoria, el método está basado en la metilación de DNA dirigida por RNA, que comprende básicamente los pasos siguientes: a) proporcionar un polinucleótido adecuado para la inducción de la metilación de DNA dirigida por RNA en dicha planta, comprendiendo dicho polinucleótido una secuencia que es complementaria a dicha secuencia diana de DNA. Normalmente tales nucleótidos son moléculas de dsRNA, en particular horquillas de RNA que pueden expresarse fácilmente en células vegetales. El paso b) de dicho método comprende la introducción de dicho polinucleótido en las células de una planta. Más adelante se analizan con más detalle diversas metodologías para la transformación de plantas. El paso c) de dicho método comprende la expresión de dichos polinucleótidos en las células transformadas. La expresión de un polinucleótido de la invención en células de la planta induce la metilación de DNA dirigida por RNA de la secuencia diana de DNA. En el paso d) se determina el patrón de metilación de dicha secuencia diana de DNA en las células transformadas de la planta. Los medios para llevar a cabo el análisis de los patrones de metilación en un DNA dado se describen abajo. En el paso e) se selecciona una planta transformada que presenta un patrón de metilación alterado en la secuencia diana de DNA y que después se cruza genéticamente consigo misma.

55 En el paso f) se selecciona una planta entre la descendencia del cruzamiento del paso e); esta planta seleccionada

se caracteriza por carecer del polinucleótido introducido según lo indicado en el paso b). Por tanto, el producto final del método descrito es una planta que contiene una secuencia diana de DNA, endógena o transgénica, que presenta citosinas metiladas, pero, esto es importante, sin que la planta contenga resto alguno del polinucleótido transgénico que ha sido necesario para inducir la metilación.

- 5 Los mecanismos de silenciamiento mediados por RNA pueden interferir con la expresión génica a diferentes niveles: algunos mecanismos dirigidos por RNA actúan a nivel postranscripcional degradando determinados RNA mensajeros. Sin embargo, las especies derivadas de dsRNA también pueden provocar cambios directos en la estructura cromatínica de las regiones de DNA con las que comparten identidad de secuencia. Por ejemplo, las plantas utilizan tales especies de RNA para fijar patrones de metilación de citosinas en secuencias de DNA idénticas, proporcionando así una marca fundamental para la formación de la heterocromatina transcripcionalmente inactiva. Este proceso se refiere en general a la metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM).

10 La RdDM se inicia por la presencia de moléculas bicatenarias de RNA (dsRNA) en el núcleo celular. Estas moléculas pueden desencadenar la metilación *de novo* de todas las citosinas situadas en las regiones de DNA complementarias a la secuencia del RNA bicatenario. Como consecuencia de ello, tanto en mamíferos como en plantas, las posiciones metiladas del DNA sirven como hitos para la remodelación de la cromatina circundante, de forma que en esos *loci* se puede formar heterocromatina densa. Ese entorno de cromatina densa impide que otras proteínas entren en contacto con el DNA. En particular, los factores de transcripción o los componentes de la máquina transcripcional no pueden ensamblarse sobre las secuencias promotoras metiladas y la transcripción no puede tener lugar en tales regiones. Está comprobado que los genes que poseen secuencias reguladoras metiladas se transcriben menos y por ende también se expresan menos.

15 Una vez que un residuo simétrico de citosina (CpG) queda metilado en un DNA vegetal ciertas enzimas, las DNA-metiltransferasas, reconocen este sustrato después de la replicación del DNA y pueden metilar la misma posición de citosina en la hebra hija; las posiciones no metiladas permanecen sin metilar. De ese modo es posible transmitir un mismo patrón de metilación del DNA durante muchas generaciones. Para su sorpresa, los inventores descubrieron que los característicos cambios epigenéticos heredables introducidos por la RdDM con el método de la presente invención pueden ser empleados para alterar la expresión de un gen diana de una planta, pero sin que el material genómico de la planta resulte modificado en absoluto.

20 Las moléculas que se utilizan normalmente para inducir la RdDM en plantas se denominan horquillas de dsRNA (hpRNA, por *hairpin*, "horquilla" en inglés). Un hpRNA puede ser codificado por una molécula de DNA que contiene secuencias con sentido y antisentido contiguas que son complementarias entre sí y permanecen separadas por una pequeña región espaciadora. La clonación directa por medio de un promotor adecuado permite expresar estas moléculas en células vegetales; estas células producirán un RNA que formará una horquilla tras su transcripción. Se supone que la horquilla de RNA es procesada en el núcleo y convertida en moléculas de dsRNA de unos 24 nucleótidos de longitud que supuestamente dirigirían la maquinaria RdDM necesaria para metilar todas las secuencias de DNA complementarias a los fragmentos de RNA.

25 Las horquillas de RNA expresadas del modo descrito no sólo son sustratos de la vía de la RdDM, sino que también inducen el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) en plantas. El PTGS es un proceso en el que los dsRNA son digeridos y convertidos en RNA interferentes pequeños (siRNA) de unos 21 nucleótidos de longitud, que guían el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés) hacia los mRNA complementarios localizados en el citoplasma, facilitando así su destrucción. El PTGS y la RdDM se utilizan normalmente en la técnica para alterar la expresión de genes diana específicos. Sin embargo, sólo la RdDM puede heredarse durante muchas generaciones sin la presencia de la molécula desencadenante.

30 Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "secuencia de ácidos nucleicos" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a una forma polimérica (dos o más monómeros) de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos. Aunque los nucleótidos suelen estar unidos a través de enlaces fosfodiéster, el término también incluye los polímeros que contienen enlaces estructurales entre amidas neutras compuestos por unidades de aminoetilglicina. Los términos se utilizan exclusivamente para referirse a la estructura primaria de la molécula. Por consiguiente, el término incluye moléculas de DNA monocatenarias y bicatenarias como las indicadas arriba. Se reconocerá que tales polinucleótidos pueden ser modificados, por ejemplo, con la adición de un marcaje consistente en un marcador radioactivo, fluorescente o de otra naturaleza, o mediante metilación, la inclusión de un casquete (*cap*), la incorporación de una sustitución de uno o varios nucleótidos naturales por un análogo de nucleótido, o una modificación internucleotídica consistente por ejemplo en enlaces sin carga (p. ej. metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos o similares), o incorporando una fracción colgante como una proteína (p. ej. una nucleasa, toxina, anticuerpo, péptido señal, poli-L-lisina o similar), incluyendo un agente intercalante como acridina o psoraleno, un agente quelante, que puede ser un metal como el boro, un metal oxidante o radioactivo, incorporando un alquilante, o bien un enlace modificado (p. ej. un ácido nucleico alfa anomérico).

35 Las especies preferidas de polinucleótidos acordes con la presente invención se seleccionan entre ssDNA, dsDNA, tDNA, ssRNA, dsRNA, shRNA, siRNA y mRNA. Preferiblemente, el polinucleótido es un DNA que codifica una molécula de dsRNA, y con preferencia una horquilla de dsRNA. Las horquillas de dsRNA se sintetizan

preferiblemente mediante la expresión de un constructo de DNA que codifica secuencias con sentido y antisentido contiguas que están separadas por un espaciador. Tras la transcripción de dicho constructo, la molécula de ssRNA generada forma una doble cadena por el apareamiento de las bases de las secuencias con sentido y antisentido.

5 El término "espaciador" utilizado en el contexto de la presente invención se refiere a secuencias cortas de polinucleótidos de un tamaño normalmente inferior a 50, y preferiblemente inferior a 40 y más preferiblemente inferior a 30 nucleótidos, y más preferiblemente aún que dé lugar a un bucle de un tamaño entre 3 y 23 nucleótidos que, en forma de molécula monocatenaria, no puede aparearse internamente sus bases. Los espaciadores constituyen el bucle de la horquilla y generalmente se utilizan en la técnica de diseño de horquillas de dsRNA para facilitar la formación estable de los brazos de la horquilla.

10 En un aspecto preferido de la invención, los polinucleótidos se proporcionan en forma de constructos intrónicos. Los intrones vegetales se caracterizan en general por una composición rica en bases A/T y por la presencia de un sitio de ajuste 5' GT y 3' AG (Goodall and Filipowicz, 1991). A tenor de estos criterios relativamente laxos para la función intrónica en las plantas, los polinucleótidos de la presente invención pueden insertarse casi en cualquier posición de un intrón vegetal funcional. Según Goodall y Filipowicz, 1991, cualquier constructo de nucleótidos de la presente
15 invención destinado a funcionar como un intrón vegetal, debe tener en total una longitud mínima de unos 70 pares de bases a fin de garantizar su ajuste.

En otra forma de realización preferida, los inventores aplicaron secuencias intrónicas con arreglo a la invención que son al menos aproximadamente un 60%, preferiblemente un 70%, más preferiblemente un 80%, más preferiblemente aún un 90%, y lo más preferible un 100% homólogas al tercer intrón del gen *LeRDR1*. Con todo, se
20 podría utilizar cualquier otro intrón vegetal funcional para generar un constructo de nucleótidos acorde con la invención.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "homólogo" u "homología" denota la similitud estructural entre dos macromoléculas, en particular entre dos polinucleótidos, independientemente de que dicha similitud sea o no sea consecuencia de una ascendencia común. Normalmente la homología indica el grado de identidad de
25 secuencia medido en porcentaje. Las secuencias que guardan una homología sustancial entre sí se pueden identificar comparándolas por medio de un software estándar disponible en los bancos de datos de secuencias o con un experimento de hibridación Southern realizado, por ejemplo, en condiciones restrictivas definidas para ese sistema particular. Definir las condiciones de hibridación adecuadas forma parte de los conocimientos de un experto en la materia. Véase, p. ej., Sambrook et al., 1989, supra.

30 Para la expresión de los constructos citados en una planta o en una célula vegetal, la invención contempla preferiblemente que los polinucleótidos descritos estén enlazados funcionalmente a un promotor y a un sitio de poliadenilación, siendo dicho promotor funcional en dicha célula de dicha planta. Como promotor en este contexto, se considera cualquier elemento de secuencia suficiente para inducir la transcripción de la secuencia contigua situada en sentido 3'. Los requerimientos mínimos de los promotores son bien conocidos por los expertos en la
35 materia y muchos de ellos se utilizan habitualmente para la expresión de genes en plantas.

En una forma de realización preferida, en el paso b) de la invención, esto es, la transformación de una célula vegetal con un polinucleótido del modo antes descrito, el método preferido se escoge entre procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica. La transformación de tejido vegetal se puede conseguir preferiblemente con el bombardeo con partículas (Klein et al., High-Velocity Microprojectiles for Delivering Nucleic Acids Into Living Cells, *Nature* 327:70-73 (1987)), también conocida como transformación balística de la célula huésped, tal y como se muestra en las patentes de EE.UU. N.º 4.945.050, 5.036.006 y 5.100.792, todas de Sanford et al., y en Emershad et al., Somatic Embryogenesis and Plant Development from Immature Zygotic Embryos of Seedless Grapes (*Vitis vinifera*), *Plant Cell Reports* 14:6-12 (1995). En el bombardeo con partículas, micropartículas de oro o tungsteno (1 ó 2 µm de diámetro) se recubren con el DNA de interés y después se disparan contra el tejido impulsadas por un gas a alta presión. De ese modo es posible introducir nucleótidos exógenos en el núcleo celular. También se pueden disparar partículas biológicamente activas (p. ej. células bacterianas desecadas que contengan el vector y el DNA heterólogo) contra las células vegetales. Además, se pueden utilizar otras modalidades de bombardeo con partículas, hoy conocidas o futuras. Otro método preferido para introducir de forma estable un constructo de ácidos nucleicos en células vegetales consiste en infectar una célula vegetal con *Agrobacterium tumefaciens* o
40 *Agrobacterium rhizogenes* previamente transformados con el constructo polinucleotídico. Tal y como se ha descrito antes, el plásmido Ti (o RI) de *Agrobacterium* permite transferir con gran eficacia una molécula exógena de ácido nucleico a células vegetales. Una variante preferida de la transformación con *Agrobacterium* consiste en la infiltración en vacío aplicada a plantas enteras (Senior, Uses of Plant Gene Silencing, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 15:79-119 (1998)). Otro método de introducción preferido consiste en la fusión de protoplastos con otras entidades, como mini-células, células, lisosomas u otros cuerpos con una superficie lipídica fusionable (Fralely et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1859-63 (1982)). Otro método preferido consiste en la introducción de una molécula de ácido nucleico en las células vegetales mediante electroporación (Fromm et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5824 (1985)). En esta técnica, protoplastos vegetales son sometidos a electroporación en presencia de plásmidos que contienen el casete de expresión. Los impulsos eléctricos de alta potencia permeabilizan de manera reversible las membranas biológicas, lo cual permite la introducción de los plásmidos. Los protoplastos vegetales
55 sometidos a electroporación reconstruyen su pared celular, se dividen y se regeneran. Otros métodos preferidos de
60

transformación consisten en la transformación vegetal mediante sustancias químicas, microinyección, abrasivos físicos, transducción viral y haces de láser (Senior, Uses of Plant Gene Silencing, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 15: 79-119 (1998)). El método de transformación escogido no es crítico para la puesta en práctica de la presente invención; cualquier método que permita una transformación eficiente de la célula huésped de elección es adecuado para ponerla en práctica.

En una forma de realización preferida de la invención, el paso d) del método inventivo descrito en la presente memoria comprende el análisis del patrón de metilación de la secuencia diana. Para la invención se prefiere el método más utilizado, consistente en analizar el DNA para detectar la presencia de 5-metilcitosina, la cual es el resultado de una reacción específica del bisulfito con la citosina, en la que, tras una hidrólisis alcalina, la citosina se convierte en uracilo, el cual es equivalente a la timina en cuanto al apareamiento con otras bases. En cambio, la 5-metilcitosina preexistente permanece inalterada bajo tales condiciones. Así pues, el DNA original queda transformado de tal modo que la metilcitosina, indistinguible al principio de la citosina por su comportamiento de hibridación, puede ser detectada como la única citosina restante por medio de técnicas de biología molecular convencionales y conocidas por los expertos en la materia, como por ejemplo, amplificación e hibridación o secuenciación. Todas estas técnicas aprovechan las distintas propiedades de apareamiento de las bases. Otra técnica preferida para determinar el estado de metilación de una secuencia dada de la invención, consiste en el uso de endonucleasas de restricción sensibles a la metilación. Estas enzimas son capaces de distinguir los sitios de reconocimiento que contienen bases metiladas, cortando o no cortando el sitio en consecuencia. El análisis del patrón de digestión de una molécula de DNA con Southern blot ofrece información sobre el estado de metilación en los sitios de reconocimiento.

En los métodos de la presente invención, los cruzamientos genéticos se llevan a cabo por autopolinización o fecundación cruzada siguiendo las técnicas habituales de la genética clásica. Por ejemplo, los métodos tradicionales de cruzamiento incluyen la selección y siembra de las semillas de las plantas portadoras de rasgos deseables.

Asimismo, en un aspecto preferido de la invención, el paso f) comprende una fase de análisis para determinar la presencia de nucleótidos transgénicos en la planta seleccionada entre la descendencia. La metodología estándar preferida incluye el análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del DNA genómico de la planta. Si se utilizan cebadores específicos para el polinucleótido introducido, la amplificación del producto de PCR sólo se producirá si la planta analizada contiene el material transgénico. De ese modo, la persona versada en la técnica puede identificar con facilidad las plantas que no albergan ninguna molécula transgénica.

Preferiblemente, en otro aspecto más de la invención, la secuencia de DNA vegetal objeto de la metilación es, entre otras opciones posibles, una secuencia reguladora endógena que regula la transcripción del DNA vegetal. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "secuencia reguladora" significa una secuencia de nucleótidos que, cuando está enlazada funcionalmente con una región codificante de un gen, afecta a la transcripción de esa región codificante, a partir de la cual se transcribe una molécula de ácido ribonucleico (RNA). Un elemento regulador generalmente puede aumentar o reducir el volumen de transcripción de una secuencia de nucleótidos enlazada funcionalmente con él, como por ejemplo una secuencia codificante, respecto al nivel con el cual dicha secuencia de nucleótidos se transcribiría sin la presencia del elemento regulador. Los elementos reguladores son bien conocidos por los expertos en la técnica y preferiblemente incluyen promotores, intensificadores, silenciadores, secuencias intrónicas silenciadoras inactivadas, secuencias no traducidas 3' ó 5' de la secuencia transcrita, preferiblemente una secuencia señal de poli-A, u otros elementos estabilizantes de proteínas o RNA, aislantes que limitan el efecto regulador de tales secuencias en las regiones definidas, u otros elementos de control de la expresión génica para regular la expresión génica o el volumen de expresión de un producto génico. El elemento regulador se puede aislar de una secuencia natural de DNA genómico o puede ser sintético, como por ejemplo un promotor sintético.

El término "gen" utilizado en el contexto de la invención describe cualquier elemento de secuencia de DNA que puede ser transcrito en RNA y que podría codificar un rasgo heredable en un organismo. La mayoría de los genes codifican proteínas, esto es, su secuencia de nucleótidos codifica la secuencia de aminoácidos del producto proteínico. Con todo, otros genes pueden codificar moléculas de RNA que no se traducen en proteínas: son los denominados RNA no codificantes (ncRNA), como por ejemplo los genes de ncRNA que codifican los RNA de transferencia (tRNA) o los RNA estructurales presentes en los grandes complejos de proteínas como el ribosoma (rRNA). Asimismo, el término "gen" incluye las regiones codificantes de especies de RNA pequeños no codificantes. Los genes de los RNA pequeños no codificantes incluyen snoRNA, microRNA, siRNA y piRNA y ncRNA largos, con ejemplos como Xist y HOTAIR.

En una forma de realización preferida, si la invención descrita se emplea para metilar una secuencia reguladora de una planta, el método comprende preferiblemente una etapa para analizar la actividad de dicha secuencia reguladora en la planta transformada. Normalmente la actividad de una secuencia reguladora se puede analizar cuantificando la cantidad de RNA transcrito del gen que es controlado por dicha secuencia reguladora. Para detectar la cantidad de transcritos, el método preferido se escoge entre el Northern blot, PCR cuantitativa en tiempo real con transcriptasa inversa o análisis por transcripción no iniciada (*run-off*).

En otro aspecto preferido, la invención se puede utilizar para alterar la expresión de un gen diana a través de la metilación de una secuencia reguladora que está conectada funcionalmente al gen. En este caso, el método

comprende preferiblemente un paso adicional g), que determina la expresión génica de dicho gen diana. Entre otros, los medios antes descritos para el análisis de la actividad de las secuencias reguladoras también se pueden aplicar para comprobar la expresión génica del gen diana. Puede ser reseñable que formas preferidas de la invención comprenden métodos para alterar la expresión de un gen diana, ya sea directamente mediante metilación dirigida de las secuencias reguladoras de dicho gen diana o indirectamente mediante la metilación dirigida de las secuencias reguladoras de un factor, p. ej. un factor de transcripción que regule la expresión de dicho gen diana.

Lo que se revela en la presente memoria es una planta sin transgenes que comprende un patrón de metilación y/o un patrón de expresión alterados, producida con arreglo a un método descrito en la presente memoria. Sin perjuicio de que pueda aplicarse a otras especies de plantas, las plantas preferidas son las siguientes: maíz (*Zea mays*), *Brassica* sp. (p. ej. *Brassica napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), alfalfa (*Medicago sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *S. vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuetes (*Rachis hypogaea*), algodón (*Gossypium barbadense*, *G. hirsutum*), batata (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), plátano (*Musa* spp.), aguacate (*Persea utililane*), higuera (*Ficus carica*), guayabo (*Psidium guava*), mango (*Mangifera indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendro (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum* spp.), avena, lenteja de agua (*Lemna*), cebada, tomate (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (p. ej. *Lactuca sativa*), judías verdes (*Phaseolus vulgaris*), judías de Lima (*Phaseolus limensis*), guisantes (*Lathyrus* spp.) y miembros del género *Cucumis* como pepino (*C. sativus*), melón cantalupo (*C. cantalupensis*) y melón bordado (*C. melo*). Asimismo, se incluyen plantas ornamentales como azaleas (*Rhododendron* spp.), hortensia (*Hydrangea macrophylla*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipanes (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petunias (*Petunia hybrida*), clavel (*Dianthus caryophyllus*), poinsetia (*Euphorbia pulcherrima*) y crisantemos. Otras plantas ornamentales incluidas dentro del campo de la invención son: *Impatiens*, *Begonia*, *Pelargonium*, *Viola*, *Cyclamen*, *Verbena*, *Vinca*, *Tagetes*, *Primula*, *Saint Paulia*, *Agertum*, *Amaranthus*, *Antihirrhinum*, *Aquilegia*, *Cineraria*, trébol, *Cosmo*, *Vigna*, *Dahlia*, *Datura*, *Delphinium*, *Gerbera*, *Gladiolus*, *Gloxinia*, *Hippeastrum*, *Mesembryanthemum*, *Salpiglossis* y *Zinnia*. Las coníferas que pueden emplearse para la puesta en práctica de la presente invención son, entre otras: pinos como el pino de incienso (*Pinus taeda*), pino antillano (*Pinus elliotii*), pino ponderosa (*Pinus ponderosa*), pino contorta (*Pinus contorta*) y pino de Monterrey (*Pinus radiata*), abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); tsuga del Pacífico (*Tsuga utililane*); picea de Sitka (*Picea glauca*) [*sic*]; secuoya (*Sequoia sempervirens*); abetos verdaderos como el abeto plateado (*Abies amabilis*) y el abeto balsámico (*Abies balsamea*); tuya gigante (*Thuja plicata*) y ciprés de Nutka (*Chamaecyparis nootkatensis*).

También se proporcionan constructos de polinucleótidos utilizables para la metilación de una secuencia diana de DNA en una célula vegetal. Un constructo de nucleótidos preferido comprende al menos un intrón vegetal, caracterizado porque al menos un dominio diana está insertado en dicho intrón vegetal, y dicho dominio diana, después del ajuste del intrón, forma un dsRNA que es complementario de dicha secuencia diana de DNA. El término "dominio diana" tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia de nucleótidos que se utiliza para disponer de un dsRNA que induzca la RdDM en el núcleo de una célula vegetal, y que contiene, al menos en parte, secuencias que son complementarias de la secuencia de DNA que es objeto de la metilación. La descripción proporciona un constructo polinucleotídico con un dominio diana, en el cual el dsRNA está codificado por secuencias con sentido y antisentido contiguas que están separadas por un espaciador.

Se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Un vector, en el contexto de la presente descripción, es una proteína o un ácido nucleico o una mezcla de ambos que es capaz de ser introducida o de introducir los polinucleótidos que alberga en el interior de una célula. Se prefiere que las proteínas codificadas por el ácido nucleico introducido se expresen en la célula tras la introducción del vector.

Preferiblemente el vector comprende vectores, plásmidos, fagémidos, fagos, cósmidos y virus recombinantes, en particular pero no exclusivamente vectores amplicón derivados de virus, vectores basados en el virus X de la patata, vectores basados en el virus del cascabeleo del tabaco, vectores basados en geminivirus como el virus del enrollamiento de la hoja del repollo y vectores basados en el virus del mosaico estriado de la cebada o en virus satélites (revisado en Curtin S.J., Wang M.-B., Watson J.M., Roffey P., Blanchard C.L. and Waterhouse P.M. (2007), capítulo 12, págs. 291-332 en Rice Functional Genomics; Challenges, Progress and Prospects. Upadhyaya, Narayana M. (Ed.), ISBN: 978-0-387-48903-2), virosomas y partículas recubiertas de ácidos nucleicos, en particular esferas de oro.

El término "molécula recombinante de ácido nucleico" se refiere a un polinucleótido fruto de la intervención humana. Una molécula recombinante de ácido nucleico puede contener dos o más secuencias nucleotídicas enlazadas de tal manera que el producto no se encuentre presente de forma natural en ninguna célula. En particular, dos o más secuencias nucleotídicas se pueden enlazar funcionalmente y, por ejemplo, pueden codificar un polipéptido de fusión, o pueden comprender una secuencia nucleotídica y un elemento regulador. Una molécula recombinante de ácido nucleico también puede estar basada en un polinucleótido natural pero ser diferente de éste, como por ejemplo un polinucleótido portador de uno o más cambios de nucleótidos: así sucede por ejemplo cuando el primer codón que suele hallarse en el polinucleótido es sustituido por un codón degenerado que codifica el mismo aminoácido o que bien introduce un cambio de aminoácido conservador, o cuando una secuencia de interés se

introduce en el polinucleótido, como por ejemplo un sitio de reconocimiento para endonucleasas de restricción o un sitio de ajuste, un promotor, un sitio de inicio de la replicación de DNA, o similares.

Se prefiere un vector recombinante que sea un vector de expresión, que opcionalmente puede comprender uno o más genes a expresar. Preferiblemente dicha expresión estará dirigida por una o varias secuencias reguladoras. La secuencia reguladora se puede extraer de una secuencia de DNA genómico natural o puede ser sintética, por ejemplo un promotor sintético.

Las secuencias reguladoras se pueden expresar constitutivamente, lo cual mantiene la expresión del gen en un nivel de actividad relativo (nivel basal), o bien pueden ser secuencias reguladoras reguladas. La secuencia reguladora expresada constitutivamente se puede expresar en cualquier tipo de célula o puede ser específica de un tejido y expresarse únicamente en determinados tipos de células, o puede expresarse en determinadas fases, es decir, sólo durante una etapa concreta del desarrollo o del crecimiento de una célula vegetal, o similar. Una secuencia reguladora como las secuencias reguladoras específicas de tejido o de fase o una secuencia reguladora inducible útil para construir un polinucleótido recombinante o poner en práctica un método de la invención puede ser una secuencia reguladora que, en general, se encuentra presente en un genoma vegetal de forma natural. Con todo, la secuencia reguladora también puede proceder de otro organismo que no sea una planta, como por ejemplo un virus vegetal, un virus animal o una célula de animal o de otro organismo pluricelular.

Una secuencia reguladora preferida útil para la expresión de polinucleótidos es un elemento promotor. Los promotores útiles incluyen, entre otros, promotores víricos y sintéticos, constitutivos, inducibles, regulados temporalmente, regulados por el desarrollo, regulados por la ubicación, regulados químicamente, activados en respuesta al estrés o específicos de tejido. Es sabido que las secuencias promotoras son fuertes o débiles. Un promotor fuerte proporciona un alto nivel de expresión génica, mientras que uno débil proporciona un nivel muy bajo de expresión génica. Un promotor inducible es un promotor que desencadena la activación o la inactivación de la expresión génica como respuesta a la adición de un agente exógeno o frente a un estímulo ambiental o del desarrollo. Es posible activar un promotor bacteriano para que induzca diversos niveles de expresión génica según la concentración de isotiopropilgalactósido añadida a células bacterianas transformadas. Una secuencia promotora aislada que sea un promotor fuerte de un ácido nucleico heterólogo es ventajosa porque proporciona un nivel de expresión génica suficiente para posibilitar la fácil detección y selección de las células transformadas y proporciona un alto nivel de expresión génica cuando se desea.

El promotor escogido dependerá de los requisitos temporales y espaciales de la expresión, así como de la especie destinataria. En ciertos casos será deseable la expresión en varios tejidos, mientras que en otros quizás se persiga únicamente la expresión en un tejido determinado, como por ejemplo en las hojas, semillas, pétalos, anteras o médula. A pesar de que muchos promotores de dicotiledóneas funcionan en monocotiledóneas y viceversa, lo más conveniente es que cada tipo se destine al mismo tipo de plantas del que proviene, esto es, los promotores de dicotiledóneas a la expresión en dicotiledóneas y los de monocotiledóneas a las mismas. En cambio, no existe restricción para el origen o la fuente de un promotor dado. Basta con que los promotores funcionen y controlen la expresión de la secuencia de nucleótidos deseada en la célula particular.

Otras secuencias que potencian la expresión génica en plantas transgénicas son las secuencias intrónicas (p. ej. de Adh 1, bronce 1, actina 1, actina 2 (WO 00/760067), o el intrón de la sacarosa sintasa), señales de poliadenilación en las secuencias 3'-UTR y secuencias líder virales (p. ej. de TMV, MCMV y AMV). Por ejemplo, es sabido que diversas secuencias líder no traducidas derivadas de virus potencian la expresión. En concreto, se ha demostrado que las secuencias líder del virus del mosaico del tabaco (TMV), el virus del moteado clorótico del maíz (MCMV) y el virus del mosaico de la alfalfa (AMV) potencian la expresión (p. ej. Gallie et al., 1987; Skuzeski et al., 1990). Otras secuencias líder conocidas en la técnica incluyen, sin limitación, las de topicornavirus, como por ejemplo, la del EMCV (región no codificante 5' del virus de la encefalomiocarditis; Elroy-Stein et al., 1989); secuencias líder de potyvirus, como por ejemplo la del TEV (virus del grabado del tabaco); líder del MDMV (virus del mosaico enano del maíz); líder de la proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina humana (BiP), (Macejak et al., 1991); líder no traducido del mRNA de la proteína de la cubierta del AMV (AMV RNA 4; Jobling et al., 1987), TMV (Gallie et al., 1989) y MCMV (Lommel et al., 1991; véase también dellaCioppa et al., 1987).

La regeneración, desarrollo y cultivo de plantas a partir de un único protoplasto vegetal, transformantes o de varios explantes transformados es bien conocida por los expertos en la materia (Weissbach and Weissbach, In: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, CA, EE.UU. (1988)). Este proceso de regeneración y crecimiento incluye normalmente las etapas de selección de las células transformadas y el cultivo de las células individuales a lo largo de las etapas normales de desarrollo embrionario hasta el estadio de plántula enraizada. Los embriones y las semillas transgénicas se regeneran de manera similar. Los brotes transgénicos enraizados se plantan en un medio de crecimiento adecuado para las plantas como el suelo.

Además se describe un equipo para producir una planta sin transgenes que presenta un patrón de metilación y/o un perfil de expresión alterados. El equipo puede incluir, entre otros, materiales de la invención seleccionados entre polinucleótidos, vectores, plásmidos, células, plantas y/o partes de los mismos.

En otro aspecto más, las plantas de la presente invención pueden ser utilizadas para la producción de semillas,

frutos, tallos, raíces y hojas, u otros productos vegetales, con la expresión alterada de un gen. Preferiblemente en este caso el gen con expresión reducida codifica o influye en un rasgo indeseable, como la aparición de la sobremaduración o productos vegetales nocivos para otros organismos, sobre todo para animales, plantas o seres humanos. Los ejemplos no sólo incluyen metabolitos secundarios tóxicos como p. ej. los alcaloides (nicotina, saponinas), sino también alérgenos o genes que influyen en el nivel de sustancias bioquímicas venenosas en una planta dada. Los "alérgenos" comprenden preferiblemente sustancias que causan una reacción alérgica como asma, rinitis alérgica, polinosis o dermatitis atópica por el contacto de un ser humano o un animal con dicha sustancia. Se incluyen preferiblemente alérgenos inhalados de polen de gramíneas o árboles. Las malas hierbas, las hierbas y los árboles son fuentes habituales de polen, y la presencia de concentraciones elevadas de tales alérgenos polínicos en el aire circundante está claramente vinculada con la hipersensibilidad al polen. Las proteínas alérgicas del polen con un peso molecular cercano a 30 kDa se liberan rápidamente y en abundancia del polen de gramíneas cuando este se hidrata. También se incluyen preferiblemente alérgenos por ingestión, lo que suele concernir a sustancias que causan alergia cuando los individuos sensibilizados comen un determinado alimento, en particular alergia a cacahuetes y/o frutos de cáscara arbóreos. Otro aspecto preferido atañe a los alérgenos de contacto, de los cuales el látex es el más importante en plantas.

Asimismo comprende sustancias que influyen en el gusto o el aroma de las plantas o de partes derivadas de las mismas, o que confieren cierto aspecto físico a la planta, como por ejemplo su color o dimensiones físicas como la altura del vegetal. Además, en el ámbito de la invención se incluye el uso antes descrito para la producción de plantas con una expresión reducida de genes que codifican o influyen en enzimas, y que son importantes en procesos bioquímicos vegetales.

A continuación se describe la presente invención a través de varios ejemplos con referencias a las figuras y secuencias adjuntas, sin que las posibilidades se limiten a dichos ejemplos. En las figuras y secuencias,

La Figura 1 muestra el constructo int-hpCMPS y su comportamiento molecular en la planta. (A) Representación esquemática del constructo int-hpCMPS. El intrón 3 de 634 pb del gen *LeRDR1* se introdujo en el interior de una unidad de cDNA de mGFP5 de 796 pb. Después, en el seno del intrón se insertó el hpCMPS de 632 pb. Aparecen indicados el promotor 35S y el terminador NOS, así como el margen derecho (BR) e izquierdo (BL) del T-DNA. Los tamaños del esquema no corresponden con el tamaño real de los fragmentos. (B) Niveles del mRNA de la GFP detectados por Northern blot después del ajuste. Línea 1, SR1 WT; líneas 2 y 3, líneas con alta y baja expresión de SR1 int-hpCMPS, respectivamente; línea 4, SR1 GFP15E. El mRNA de la GFP tiene el tamaño correcto después del ajuste, en comparación con el control positivo SR1 GFP15E (tabaco transgénico sin intrón en el GFP). La ausencia de bandas de peso molecular más alto indica la ausencia de moléculas de pre-mRNA sin ajustar. La sonda utilizada era el cDNA entero de la GFP. El rRNA 25S debajo del blot indica la carga igual de las muestras (10 µg de RNA total). (C) Niveles de proteína GFP después del ajuste determinados por Western blot. Línea 1, SR1 WT; líneas 2 y 3, líneas con alta y baja expresión de SR1 int-hpCMPS, respectivamente; línea 4, SR1 GFP15E. La proteína GFP tenía el tamaño correcto (29 KDa), en comparación con una GFP transgénica de tabaco conocida que no contenía intrón. Para la detección se utilizó un anticuerpo anti-GFP.

La Figura 2 muestra un análisis Northern blot de siRNA en SR1 int-hpCMPS. (A) Northern blot, siRNA de CMPS en SR1 inthpCMPS. Línea 1, marcador; línea 2, SR1 WT; líneas 3 y 4, SR1 inthpCMPS de baja y alta expresión, respectivamente. Sólo se detectaron siRNA CMPS de 24-nt y sólo en la línea de alta expresión (línea 4); no se detectaron siRNA de 21-nt. Como sonda se usó DNA de hpCMPS de 632 pb. El rRNA 25S se usó como control de carga. Northern blot, siRNA de GFP. (B) Línea 1, SR1 int-hpCMPS sometida a agroinfiltración con un constructo en horquilla de GFP (pCV702SM GpG); línea 2, SR1 int-hpCMPS; línea 3, SR1 WT. En la línea 1 se observaron siRNA de GFP de 21 y 24 nt, lo cual significa que la maquinaria productora de los siRNA de 21-nt no se ve afectada en el SR1 int-hpCMPS (donde sólo se observaron siRNA de CMPS de 24-nt). En los SR1 int-hpCMPS no sometidos a agroinfiltración no se observaron siRNA de GFP de ningún tamaño, lo cual indica que el mRNA de la GFP después del ajuste es estable y no se produce transitoriedad. Como sonda se utilizó el cDNA entero de la GFP. El rRNA 25S se utilizó como control de carga.

La Figura 3 muestra el análisis de metilación del transgén int-hpCMPS efectuado por Southern blot. (A) Representación esquemática del transgén int-hpCMPS y de los fragmentos que se espera que surjan tras la digestión completa y parcial con *HaeIII* (FC y PC, respectivamente), la cual queda bloqueada cuando su citosina interna está metilada. La barra negra indica la sonda utilizada. (B) Análisis de metilación por Southern blot. 20 µg de DNA se digirieron con *DraI*+*HaeIII* y se analizaron en gel de agarosa al 1% (*DraI* carece de diana de restricción en el transgén). Línea 1, SR1 int-hpCMPS; línea 2, SR1 WT; línea 3 SR1 WT inoculada con algunos pg de plásmido pPCV702SM int-hpCMPS; línea 4, exposición más ligera de la línea 3. En el plásmido (línea 3), sólo emiten luz los productos de digestión completa (757 pb, 376 pb y 153 pb). No obstante, en el SR1 int-hpCMPS (línea 1), donde la metilación afecta a la horquilla, se aprecian todos los fragmentos de digestión parcial (1286 pb, 910 pb, 529 pb) además de los fragmentos de digestión completa.

La Figura 4 muestra el análisis de metilación del transgén int-hpCMPS mediante secuenciación por bisulfito. Se analizaron por separado dos fragmentos del transgén. El primero (CMPS254) consistía en una parte del GFP 5', intrón y parte del CMPS antisentido. El segundo (CMPS360) consistía en parte del espaciador, del CMPS con sentido y parte del intrón. Encima de cada secuencia aparece representado el estado de metilación de las citosinas

de SR1 int-hpCMPS (indicado con cuadrados), mientras que debajo de ellas se muestra en el SR1 WT inoculado con plásmido pPCV702SM int-hpCMPS (indicado con círculos). El círculo/cuadrado vacío corresponde a un grado de metilación de citosinas del 0-10%, el semilleno a un 50-60% y el lleno al 90-100% de metilación. Este porcentaje está basado en el análisis de 10 clones independientes. Las secuencias intrónicas aparecen subrayadas, las secuencias CMPS se muestran en negrita y la secuencia del espaciador en letras minúsculas. Las dianas de restricción 5'-TCTAGA-3' de XbaI y 5'-ACGT-3' de HpyCH4IV aparecen indicadas como una secuencia enmarcada.

La Figura 5 muestra la validación de los datos obtenidos con el bisulfito mediante las digestiones con Xba I e HpyCH4IV de los productos de la PCR. (A) El producto de PCR CMPS259 se expuso a XbaI (véase Figura 4, secuencia enmarcada), que lo escindió en un producto de 150 pb y otro de 104 pb. Línea 1, amplicón CMPS259 del plásmido sin tratar y sin digerir; línea 2, amplicón CMPS259 del plásmido no tratado y digerido con XbaI; línea 3, amplicón CMPS259 del plásmido tratado con bisulfito y digerido con XbaI; línea 4, amplicón CMPS259 de tabaco tratado con bisulfito y digerido con XbaI. El amplicón CMPS259 procedente del plásmido no tratado fue escindido casi en un 100% (línea 2), mientras que el plásmido tratado con bisulfito (línea 3) no fue digerido en absoluto, lo cual indica la resistencia a la XbaI propiciada por la desaminación de las citosinas y su transformación en timinas y la destrucción de la diana de restricción. En el caso del amplicón CMPS259 obtenido de la planta, casi el 50% de las citosinas aparecen metiladas (Figura 4), y sólo el 50% de los amplicones fueron escindidos, resultados que validan los datos obtenidos con el tratamiento con bisulfito. (B) El producto de la PCR de CMPS360 se expuso a HpyCH4IV (véase Figura 4, secuencia enmarcada), que lo dividió en 231 pb y 129 pb. Línea 1, amplicón CMPS360 del plásmido sin tratar y sin digerir; línea 2, amplicón CMPS360 del plásmido no tratado y digerido con HpyCH4IV; línea 3, amplicón CMPS360 del plásmido tratado con bisulfito y digerido con HpyCH4IV; línea 4, amplicón CMPS360 de tabaco tratado con bisulfito y digerido con HpyCH4IV. El amplicón CMPS360 del plásmido no tratado fue digerido casi al 100% (línea 2), mientras que el plásmido tratado con bisulfito (línea 3) no fue digerido en absoluto, lo cual indica la resistencia a la HpyCH4IV propiciada por la desaminación de las citosinas que las transforma en timinas y la destrucción de la diana de restricción. En el caso del amplicón CMPS360 obtenido de plantas, casi el 100% de las citosinas aparecen metiladas (Figura 4), y casi el 100% del amplicón estaba digerido, resultados que validan los datos obtenidos con el tratamiento con bisulfito.

La Figura 6 muestra la secuenciación por bisulfito de la capacidad del int-hpCMPS para desencadenar la RdDM en *trans* del constructo sensor P_{CMPS}-rsGFP. En el constructo sensor, el cDNA de rsGFP (791 pb) se transcribe a partir del promotor CmYLCV CMPS (406 pb). La parte del promotor que se solapa con la secuencia del CMPS utilizada en hpCMPS aparece indicada en color negro (240 pb). Esta es la región donde se espera que se produzca la metilación en *trans*. El fragmento analizado con la secuenciación por bisulfito tenía 226 pb (CMPS226) y presentaba una región solapada y otra no solapada con la molécula desencadenante de la metilación int-hpCMPS. Encima de la secuencia se indica el estado de metilación del plásmido (círculos), del SR1 PCMPS-rsGFP (cuadrados) y del SR1 PCMPS-rsGFP X SR1 int-hpCMPS (triángulo). El círculo/cuadrado/triángulo vacío corresponde a un grado de metilación de las citosinas del 0-10%, el semilleno al 50-60% y el lleno al 90-100% de metilación. Este porcentaje está basado en el análisis de 10 clones independientes. Si bien el PCMPS analizado del plásmido o la planta antes del cruzamiento con el int-hpCMPS desencadenante estaba completamente transformado, después del mismo la parte que se solapaba con el hpCMPS desencadenante (secuencia en negrita) estaba completamente metilada y dicha metilación no se había extendido a la región no solapada del PCMPS.

La Figura 7 muestra el análisis de la capacidad del int-hpCMPS para desencadenar la degradación del RNA en *trans* del constructo sensor GUS:CMPS. (A) Representación esquemática del constructo sensor. Una parte de 240 pb del promotor CMPS se fusionó con el extremo 3' de una unidad de cDNA de GUS de 1810 pb. El constructo entero estaba controlado por el promotor 35S y el terminador NOS. (B) Representación esquemática del constructo desencadenante pA-hpCMPS. El hpCMPS de 632 bp no está insertado en el interior de un intrón y está bajo el control del promotor 35S y del terminador NOS. (C) Co-agroinfiltración del constructo sensor GUS:CMPS con un vector vacío (control, línea 1), int-hpCMPS (línea 2) y pA-hpCMPS (línea 3). El análisis Northern no sólo demostró que en el caso de pA-hpCMPS (línea 3) se producía una disminución sustancial del RNA sensor GUS:CMPS. Como sonda se utilizó un fragmento del cDNA de GUS de 800 bp. El rRNA 25S sirve como control de carga. (D) Misma combinación de co-agroinfiltración que arriba. El análisis Northern evidenció la presencia de mRNA de la GFP del tamaño correcto, lo que indica que tras la agroinfiltración (línea 2) el int-hpCMPS había sufrido un ajuste correcto. Como sonda se utilizó el cDNA entero de la GFP. El rRNA 25S sirve como control de carga. (E) Misma combinación de co-agroinfiltración que arriba. El análisis de siRNA evidenció siRNA de GUS de 21-nt únicamente en el caso de pA-hpCMPS (línea 3). Estos siRNA de GUS son secundarios e indican que únicamente el pA-hpCMPS (línea 3) pero no el int-hpCMPS (línea 2) es capaz de generar RNAi en *trans* del constructo sensor GUS:CMPS.

La SEQ ID N.º 1 muestra el tercer intrón del gen *LeRDR1*

La SEQ ID N.º 2 muestra el constructo recombinante GFPint

La SEQ ID N.º 3 muestra la secuencia del promotor CMPS

La SEQ ID N.º 26 muestra la secuencia de la sonda GUS

La SEQ ID N.º 27 muestra la secuencia de la sonda GFP5, y

La SEQ ID N.º 28 muestra la secuencia de la sonda CMPS.

5 Las SEQ ID N.º 4 a 25 muestran las secuencias del cebador y de la sonda utilizadas en los ejemplos, de acuerdo con las tablas siguientes:

	Nombre del cebador	Secuencias de 5' a 3'
	GFPPvull	GATACGTGCAGctgAGGACCATC (SEQ ID NO. 4)
	GFPMyI	GATACGgagtcGAGAGGACCATC (SEQ ID NO. 5)
	IntEcoI 05I	tacGTAAATTTTACGTTGGAAAC (SEQ ID NO. 6)
10	IntXbaI	GTAAGTTTcTAGAAGGCTTAACC (SEQ ID NO. 7)
	IntBglII	CATGAGTCATGAGATcTAAAGGC (SEQ ID NO. 8)
	IntPvuII	GTGTTAAACTTTGATGACAGctg (SEQ ID NO. 9)
	CMPSBglIIIF	agaTCTGACGAACAAATAAGA (SEQ ID NO. 10)
	CMPSBamHIF	GAACAAATAgGATcCGTGGCC (SEQ ID NO. 11)
15	CMPSXbaIR	TTCTAGAGATCCTACTTA (SEQ ID NO. 12)
	CMPSBglIIIR	TTCTAGAGATCTTACTTCTA (SEQ ID NO. 13)
	FpAtmr	GTaGATcTACGCAGCCGCTTT (SEQ ID NO. 14)
	RpAtmr	TGTTAGCCTAGGGCTTTA (SEQ ID NO. 15)
	pTBglIIIF	GCCGCCAAaGATCTGATG (SEQ ID NO. 16)
20	pTPstIR	CGTCCTGCAGTTCATTCA (SEQ ID NO. 17)
	pTXbaIF	TCTCTAGAAGCTTGTCGA (SEQ ID NO. 18)
	pTBglIIIR	TGTCCAGATcCCCAGTA (SEQ ID NO. 19)

Tabla 1. Cebadores empleados para la generación de los constructos. Los sitios mutados aparecen indicados con letras minúsculas.

	Nombre del cebador	Secuencias de 5' a 3'
25	BisF1	GTGAAATAATGYGTYTGAYAAAGGTTAG (SEQ ID NO. 20)
	BisR1	ACATTTCCCAAACCTACCCTTACTTATTTTC (SEQ ID NO. 21)
	BisF2	GTYAYTAYTTTTYTYTTATGGTGTTAATG (SEQ ID NO. 22)
	BisR2	TCTATAAATACTTARCCCTCCCTCATT (SEQ ID NO. 23)
30	BisF3	GAATYAATTTGAYTATYTTTGAAAYTA (SEQ ID NO. 24)
	BisR3	AATRATTTCCCTCCATAARTTARTRTA (SEQ ID NO. 25)

Tabla 2. Cebadores utilizados para la PCR con bisulfito.

Ejemplos

Introducción

35 Un sistema que permita la iniciación de RNA de interferencia (RNAi) en el núcleo (n) pero no en el citoplasma (c), en particular la RdDM, requiere moléculas desencadenantes que permanezcan confinadas en el núcleo y acaben exclusivamente en la vía nuclear del RNAi. Con el fin de cumplir este requisito, se aprovechó el hecho de que las secuencias intrónicas permanecen en el núcleo después del ajuste (Qiau et al., 1992). Se ha planteado que si un RNAi desencadenante se inserta en un intrón, debería quedar retenido en el núcleo como parte de este, pero no
40 está claro si tal desencadenante afectaría negativamente al proceso de ajuste en las células vegetales. Asimismo,

se desconoce si las moléculas intrónicas desencadenantes pueden ser procesadas por la maquinaria de la RdDM.

Ejemplo 1: Generación del constructo *int-hpCMPS* e introducción en tabaco

Como constructo transgénico primario portador del intrón, el cDNA entero (634 pb) del intrón 3 del *LeRDR1* (véanse los datos de la secuencia en la SEQ ID N.º 1) se insertó en el cDNA del *mGFP5* (Haseloff et al., 1997), dando como resultado el constructo *GFPint* (véase la secuencia en la SEQ ID N.º 2). Se seleccionó una horquilla de RNA (hpRNA) como RNAi desencadenante dirigido al promotor de un gen marcador. De este modo se pudo estudiar la *trans*-metilación de la secuencia marcadora eludiendo la posible interferencia con el RNA producido por el gen marcador. El constructo de hpRNA contenía un fragmento antisentido de 240 pb y un fragmento con sentido de 215 pb del promotor *CMPS* del virus de la hoja amarilla y enrollada del *Cestrum* (CmYLCV) (Stavolone et al., 2003; SEQ ID N.º 3). Los fragmentos con sentido y antisentido del *CMPS*, que compartían 214 pb de homología, quedaron separados por un fragmento invertido de 177 pb del intrón 3 del *LeRDR1* para producir el constructo en horquilla *CMPS* (*hpCMPS*). Por último, este *hpCMPS* se insertó en el intrón de *GFPint* (Fig. 1A) para obtener el constructo *int-hpCMPS*. El sitio de inserción del *hpCMPS* se escogió al azar ya que los intrones vegetales no tienen requisitos absolutos para los puntos de ramificación y los segmentos polipirimidínicos. La funcionalidad del intrón queda asegurada por una composición rica en bases A/T, un tamaño mínimo de 70 pb y la presencia de un sitio de ajuste 5' GT y 3' AG (Goodall and Filipowicz, 1991).

Los constructos *GFPint* e *int-hpCMPS* se clonaron en la casete de expresión del vector binario pPCV702SM (Wassenegger et al., 1994). Los derivados del vector binario se introdujeron en células de *Agrobacterium tumefaciens* con las que después se transformaron las plantas de tabaco. Transformantes independientes (SR1-GFPint y SR1-int-hpCMPS) se analizaron con PCR para detectar la presencia del T-DNA. La inspección visual con luz UV reveló que las plantas SR1-GFPint y SR1-int-hpCMPS portadoras del T-DNA emitían fluorescencia verde, aunque en diversos grados. El hecho de que las plantas transgénicas fueran fluorescentes indica que la GFP era funcional. Esto, a su vez, indica que ambos transgenes habían sufrido el proceso de ajuste. Para averiguar si el intrón había sufrido el ajuste de manera completa y correcta en la planta, se efectuó un análisis por Northern blot. Se extrajo todo el RNA de líneas individuales de SR1-GFPint y SR1-int-hpCMPS y se hibridó con una sonda de cDNA de *GFP*. Todas las plantas SR1-GFPint analizadas produjeron un RNA con un tamaño equivalente al RNA de la línea SR1GFP que expresaba la GFP. La línea SR1GFP contenía el mismo cDNA del *GFP* que incorporaban los constructos *GFPint* e *int-hpCMPS* pero carecía de un intrón (Vogt et al., 2004). De manera similar, sendas líneas SR1-int-hpCMPS que emitían una fluorescencia débil (L1) y moderada (H1) fruto de la GFP presentaron un RNA hibridante con un tamaño equivalente al del RNA del transgén completamente desprovisto de intrones (Fig. 1B, líneas 1 y 2). Ningún otro RNA se hibridó con la sonda, lo cual demuestra que el pre-mRNA del *GFP* había sido sometido al proceso de ajuste enteramente. Por último, se hizo un análisis Western blot de los extractos proteínicos de las líneas SR1-int-hpCMPS L1 y H1. Un anticuerpo específico de la GFP detectó una sola proteína de 29 kDa correspondiente a la GFP expresada en la línea SR1GFP (Fig. 1C). En resumen, el intrón 3 del *LeRDR1* demostró ser funcional y fue sometido al proceso de ajuste con eficacia y precisión, por mucho que contuviera el fragmento *hpCMPS* de 632 bp.

Ejemplo 2: El hpRNA del *int-hpCMPS* fue procesado y convertido en moléculas de siRNA de 24-nt pero no de 21-nt

El RNA total de las líneas SR1-int-hpCMPS L1 y H1 se sometió al análisis de siRNA. La hibridación del Northern blot con una sonda específica del *CMPS* sólo reveló una señal en la muestra de la línea H1 (Fig. 2A, línea 4). El tamaño del RNA hibridado correspondió a moléculas de siRNA de 24-nt de longitud; no se detectó ningún siRNA del *CMPS* que fuera de 21-nt. Para conseguir una buena resolución de los RNA pequeños en el tabaco, en lugar de analizar como de costumbre 20-30 µg sólo se cargaron 5 µg de RNA total en el gel puesto que, pese a que la carga de concentraciones elevadas de RNA aumenta las señales de hibridación de siRNA esto impide que la separación del RNA pequeño sea satisfactoria. Por esa razón, los siRNA de 24-nt sólo se detectaron en las muestras de la línea SR1-int-hpCMPS H1 (Figura 2A, línea 4) pero no en las de la línea L1 (Figura 2A, línea 3).

Los transcritos transgénicos pueden inducir la producción de siRNA de 21-nt y de 24-nt (Wang et al., 2008). No obstante, sorprendentemente la expresión del constructo del transgén *int-hpCMPS* representa el primer ejemplo en el que sólo se acumularon siRNA de 24-nt pero no de 21-nt. La agroinfiltración de un constructo en horquilla de la GFP en plantas SR1-int-hpCMPS generó los dos tamaños de siRNA de la GFP (Figura 2B, línea 1), lo cual indica que la biosíntesis de siRNA de 21-nt no se vio afectada en las líneas SR1-int-hpCMPS. Por último, el hecho de que no se detectaran siRNA del *GFP* en las líneas SR1-int-hpCMPS que no fueron infiltradas demuestra que no se indujo el silenciamiento de GFP (Fig. 2B, línea 2). Este hallazgo concuerda con la ausencia de productos de degradación del mRNA del *GFP* en las líneas SR1-int-hpCMPS (Fig. 1).

Sorprendentemente, los datos indican que el procesamiento del *int-hpCMPS* en moléculas de siRNA fue catalizado exclusivamente por la maquinaria de nRNAi. Es más, la ausencia de moléculas de siRNA del *GFP* indica que los nRNAi no estuvieron asociados a un silenciamiento transitorio. En este contexto, también cabe señalar que tampoco aparecieron siRNA intrónicos.

Ejemplo 3: Iniciación de la RdDM en líneas SR1-int-hpCMPS

A fin de investigar la capacidad del hpRNA intrónico para desencadenar la RdDM del DNA análogo, el estado de metilación del transgén int-hpCMPS se examinó mediante Southern blot con la endonucleasa de restricción sensible a la metilación HaeIII. Las secuencias con sentido y antisentido del CMPS contenían una sola diana de restricción HaeIII (5'-GGCC-3') cada una (Fig. 3A, H(2) y H(3)). Por su parte, la secuencia de GFP albergaba otras dianas de HaeIII situadas en posiciones hacia 5' y hacia 3' (Fig. 3A, H(1) y H(4)). En las secuencias internas del CMPS, las citosinas situadas dentro de las dianas H(2) y H(3) de la HaeIII no estaban ni en un contexto de CpG ni de CpHpG (H = C, T o A). Por tanto, el análisis con Southern blot de las secuencias del CMPS expuestas a la HaeIII sólo permitió detectar la metilación asimétrica, que es el rasgo distintivo de la RdDM (Pélissier et al., 1999). Además de la digestión con HaeIII, el DNA genómico se predigerió con la endonucleasa de restricción sensible a la metilación DraI. La predigestión tenía como objetivo reducir el tamaño medio de los fragmentos de restricción de 10 a 1 kb. El transgén *int-hpCMPS* no contenía ninguna diana para DraI (5'-TTTAAA-3'). Como control para determinar la completa digestión del DNA se empleó 1 ng de DNA del plásmido pPCV702SM int-hpCMPS mezclado con 20 µg de DNA de tabaco natural (Fig. 3B, línea 3). La hibridación con la sonda CMPS (Fig. 3A, línea negra) reveló tres fragmentos con tamaños de 153 pb, 376 pb y 757 pb. El DNA de la línea SR1-int-hpCMPS H1 produjo tres fragmentos de HaeIII hibridantes adicionales, de un tamaño de 529 pb, 910 pb y 1286 pb (Fig. 3B, línea 1). Estos fragmentos se pueden explicar por la digestión parcial de las dianas de HaeIII H(2) y H(3) y la escisión completa de las dianas de HaeIII H(1) y H(4). Estos datos indican que las dianas H(2) y H(3) fueron metiladas en parte mientras que las citosinas de las dianas 1 y 4 quedaron virtualmente libres de metilación.

Con el fin de obtener datos detallados sobre el estado de metilación del transgén se llevó a cabo una secuenciación con bisulfito. El tratamiento del DNA con bisulfito sódico provoca la conversión de las citosinas no metiladas en uracilo, pero no la de las citosinas metiladas. Durante la amplificación por PCR las DNA-polimerasas confunden el uracilo con la timina y, por tanto, la hebra de DNA recién sintetizada contiene adenina en lugar de guanina en las posiciones complementarias de las citosinas convertidas. Las secuencias de los productos de PCR derivados del DNA tratado con bisulfito presentan citosinas en el lugar de las citosinas metiladas y timinas en el lugar de las citosinas no metiladas. Para asegurarse de que las citosinas situadas dentro de las secuencias de interés podían ser transformadas totalmente se empleó como control la secuenciación por bisulfito de DNA plasmídico. Aproximadamente 40 pg de DNA del plásmido pPCV702SM int-hpCMPS se mezclaron con 2 µg de DNA de tabaco natural para excluir cualquier efecto inhibitorio del DNA genómico.

La muestra de DNA plasmídico/tabaco y 2 µg de DNA genómico agrupados de las tres líneas SR1-int-hpCMPS independientes, a saber, L1, M1 y H1, se sometieron a la secuenciación con bisulfito. Se analizaron dos fragmentos del transgén: el fragmento de 254 pb del CMPS (CMPS₂₅₄), que contenía una parte de 5' GFP, el intrón 5', las secuencias antisentido de CMPS y el espaciador 5'; y el fragmento de 360 pb del CMPS (CMPS₃₆₀), que contenía el espaciador 3', la secuencia con sentido de CMPS y una parte del intrón 3' (Fig. 4). La secuenciación por bisulfito es específica de la hebra, pero el análisis se centró en la hebra superior al utilizar en la amplificación PCR las parejas de cebadores BisF2/BisR2 para el fragmento CMPS₂₅₄ y BisF3/BisR3 para el CMPS₃₆₀ (véanse las secuencias de los cebadores en la Tabla 1). La secuenciación de los productos clonados en la PCR reveló que los insertos originados a partir del plásmido pPCV702SM int-hpCMPS se habían transformado completamente, lo cual confirma que el DNA plasmídico no estaba metilado (Fig. 4, línea inferior). En cambio, las secuencias con sentido y antisentido de CMPS amplificadas a partir del transgén integrado en el genoma de la planta estaban metiladas casi al 100% (Fig. 4, línea superior). Es importante señalar que la metilación no se extendió a los flancos de las secuencias específicas de CMPS. Todas las citosinas ubicadas en las secuencias intrónicas, de la GFP y del espaciador se habían transformado en todos los clones (Fig. 4, línea superior). En resumen, estos datos demuestran que una horquilla intrónica puede iniciar con eficacia la RdDM y propiciar una metilación potente y específica *de novo* de la secuencia análoga.

Los productos de PCR obtenidos del DNA tratado con bisulfito no se secuenciaron directamente. Sólo se analizaron los clones que contenían productos de PCR. Así pues, se examinó el estado de metilación del transgén en células sueltas. Como en todos los casos sólo se secuenciaron 10 clones, no se presentaron datos estadísticamente relevantes. Y para validar, al menos en parte, los datos obtenidos en la secuenciación con bisulfito, se llevó a cabo un análisis de restricción de los productos de la PCR. Si un residuo de citosina de una diana de restricción de la secuencia auténtica es transformado, la diana queda destruida y, por tanto, los productos de PCR amplificados a partir de este DNA no contendrán la diana. El análisis de tales productos ofrece una visión general del estado de metilación del DNA del tejido del cual se ha extraído el DNA genómico. Pero sólo se puede analizar un número limitado de dianas. Dos partes del transgén se analizaron con bisulfito. En el fragmento de 254 pb CMPS₂₅₄, la unión entre el intrón 5' y el fragmento antisentido específico del CMPS que contenía una diana para XbaI (5'-TCTAGA-3') (Fig. 4). La secuenciación con bisulfito del DNA extraído de las plantas SR1-int-hpCMPS indicó que esta diana de XbaI estaba metilada en casi el 50% de las células foliares (Fig. 4). Por ello, cabría esperar que el producto de la PCR amplificado a partir de este DNA sea digerido aproximadamente en un 50%. La digestión completa del CMPS₂₅₄ con XbaI genera dos fragmentos de 150 y 104 pb (Fig. 5A, línea 2). Y en concordancia con la premisa anterior, aproximadamente la mitad del producto de PCR estaba digerido (Figura 5A, línea 4). A diferencia de la digestión parcial, el producto de PCR amplificado a partir del DNA plasmídico pPCV702SM int-hpCMPS tratado con bisulfito estaba completamente digerido (Figura 5A, línea 3). Este resultado concuerda con los datos del bisulfito presentados en la Figura 4.

El CMPS₃₆₀ de 360 pb fue analizado con HpyCH4IV (5'-ACGT-3'). La digestión completa con HpyCH4IV da como resultado sendos fragmentos de 129 y 231 pb (Fig. 5B, línea 2). En el DNA de las líneas SR1-int-hpCMPS esta diana parece estar metilada casi al 100% (Fig 4). En concordancia con lo anterior, la digestión del producto de la PCR del DNA genómico de esas líneas tratado con bisulfito sólo produjo los fragmentos de 129 y 231 pb, sin que se detectara ningún fragmento entero de 360 pb (Fig 5B, línea 4). Como era previsible, el producto de PCR del DNA plasmídico tratado con bisulfito no fue digerido por la HpyCH4IV (Figura 5B, línea 3). En resumidas cuentas, el análisis por Southern blot, la secuenciación con bisulfito y el análisis con enzimas de restricción de los productos de PCR derivados del DNA tratado con bisulfito demuestran claramente que el constructo int-hpCMPS inició eficazmente la RdDM. La metilación fue muy específica de las secuencias que compartían homología con la parte bicatenaria del hpRNA del CMPS. Ni el espaciador ni las secuencias intrónicas que flanqueaban a la copia sentido y antisenso del CMPS fueron blanco de la RdDM.

Ejemplo 4: El *int-hpCMPS* desencadenó con eficacia la *trans*-metilación de un constructo sensor

Se ha demostrado que el hpRNA del CMPS indujo la metilación específica de la región del transgén integrada en el genoma a partir de la cual se transcribió el hpRNA. Con objeto de investigar si además de esta *cis*-metilación, el *int-hpCMPS* es capaz de desencadenar la *trans*-metilación, se introdujo un constructo 'sensor de la metilación' en tabaco SR1. El constructo comprendía una unidad de cDNA de *red-shifted GFP (rsGFP)* de 791 bp regulada por el promotor entero del CMPS, de 406 pb de longitud (*P_{CMPS}-rsGFP*) (Fig. 6A). Siete líneas distintas de plantas SR1-*P_{CMPS}-rsGFP* que habían sido analizadas con Northern blot para confirmar que expresaban el *rsGFP* expresaron moderadamente el transgén. En estas líneas no se detectaron moléculas de siRNA del CMPS. La línea SR1-*P_{CMPS}-rsGFP* número 1 se cruzó genéticamente con la línea SR1-int-hpCMPS H1 para engendrar la línea SR1-*P_{CMPS}/hpCMPS* número 1. La descendencia de este cruce se cultivó y con PCR se comprobó que las plantas contenían ambos transgenes. La descendencia SR1-*P_{CMPS}/hpCMPS* acumulaba siRNA del CMPS en el mismo grado hallado en la línea parental SR1-int-hpCMPS H1. De nuevo sólo se detectaron siRNA de 24-nt, lo cual indica que la presencia del *P_{CMPS}/hpCMPS* no influyó en la producción de siRNA del CMPS. A fin de averiguar si la presencia del transgén *int-hpCMPS* conducía a la metilación de la secuencia *P_{CMPS}* en *trans*, se llevó a cabo la secuenciación con bisulfito. Para el análisis se seleccionó un fragmento de 226 pb del promotor del CMPS (*CMPS₂₂₆*). Cabe señalar que sólo la mitad 3' de este fragmento se solapaba con la secuencia *hpCMPS* (Fig. 7). El DNA de 3 plantas descendientes distintas de la línea SR1-*P_{CMPS}/hpCMPS* número 1 se agrupó, se sometió al tratamiento con bisulfito y se amplificó con la pareja de cebadores BisF1/BisR1 (véanse las secuencias de los cebadores en la Tabla 1). El DNA del plásmido pPCV800 CMPS-rsGFP que contenía la secuencia *P_{CMPS}-rsGFP* y el DNA genómico de la generación T1 de la línea SR1-*P_{CMPS}-rsGFP* número 1 sirvieron como controles (Fig. 7). En estos controles, el *CMPS₂₂₆* apareció virtualmente libre de metilación (Fig. 7, línea inferior y media, respectivamente). En la descendencia SR1-*P_{CMPS}/hpCMPS*, la mitad 3' del *CMPS₂₂₆* que se solapaba con la región *hpCMPS* estaba completamente metilada (Fig. 7, secuencia en negrita). Es importante destacar que la parte del promotor CMPS que no estaba solapada no estaba metilada, lo que demuestra que la metilación no se propagó a otros segmentos en los transformantes dobles. Tomados en conjunto, nuestros datos demuestran que el constructo de horquilla intrónica del CMPS desencadenó una metilación extremadamente eficiente y muy específica de la secuencia sensor en *trans*.

Ejemplo 5: El *int-hpCMPS* no desencadenó la degradación del RNA de un constructo sensor

El constructo *int-hpCMPS* desencadenó con eficiencia la metilación en *cis* y en *trans*. Sin embargo, no está claro si el hpRNA del CMPS puede ser capaz de mediar la digestión del RNA diana. Apenas se detectaron siRNA del CMPS del constructo intrónico y los detectados sólo tenían 24-nt de tamaño (Fig. 2A, línea 4). No se puede descartar que el sistema de detección no tuviera la sensibilidad suficiente para detectar todos los siRNA producidos en las líneas SR1-int-hpCMPS, entre ellos los de 21-nt. Cabe la posibilidad de que estos se acumularan por debajo del límite de detección pero fueran lo suficientemente abundantes para iniciar el PTGS. Para estudiar si el PTGS de *int-hpCMPS* podría iniciarse, se generó un constructo sensor de PTGS. El cDNA del gen de la β -glucuronidasa (*GUS*) se fusionó transcripcionalmente por su extremo 3' con un fragmento del promotor del CMPS de 240 pb de longitud. El fragmento CMPS de 240 bp correspondió exactamente con la copia con sentido del CMPS presente en el constructo *int-hpCMPS* (Fig. 1A). El producto de fusión (*GUS:CMPS*) se insertó en el casete de expresión del vector binario pPCV702SM (Fig. 7A) y este a su vez se introdujo en *A. tumefaciens*. Como control de desencadenamiento del PTGS se sintetizó un casete que contenía una horquilla CMPS en la que el constructo de hpRNA no estaba localizado en un intrón, sino flanqueado por el promotor 35S y el terminador NOS. Esto se consiguió omitiendo la GFP y las secuencias intrónicas del casete original pPCV702SM *int-hpCMPS* (Fig. 7B). El constructo resultante, *pA-hpCMPS*, también se introdujo en *A. tumefaciens*. Nuestra predicción es que, a diferencia del hpRNA producido por el *int-hpCMPS*, el hpRNA del *pA-hpCMPS* saldría del núcleo al citoplasma, donde sería procesado y convertido en moléculas de siRNA de 24 y 21-nt, siendo estos últimos los que provocarían el silenciamiento del mRNA de *GUS:CMPS*.

El *GUS:CMPS* se introdujo por co-agroinfiltración en plantas naturales con las siguientes combinaciones: (i) *GUS:CMPS* + Δ (casete de expresión sin 35S y pA), (ii) *GUS:CMPS* + *int-hpCMPS* y (iii) *GUS:CMPS* + *pA-hpCMPS*. El RNA total se aisló 4 días después de la inoculación y se analizó. Los niveles de mRNA de *GUS:CMPS* habían descendido de forma muy acusada en (iii) respecto a (i) y (ii). La presencia de mRNA maduro de la GFP demostró que después de la agroinfiltración la expresión y el procesamiento de la horquilla intrónica no resultó afectada. Sólo se detectaron muchos siRNA de CMPS en el caso de *pA-hpCMPS*, pero no en el de *int-hpCMPS*, aunque el

constructo intrónico fue procesado eficientemente. Los datos anteriores demuestran que el *int-hpCMPS* no pudo desencadenar la degradación del mRNA sensor, a diferencia del *pA-hpCMPS*. Sólo se produjeron siRNA secundarios de GUS a escala local tras la co-agroinfiltración de *GUS:CMPS* con *pA-hpCMPS*, pero no con *int-hpCMPS*.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Johannes-Gutenberg Universität Mainz
- <120> MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA PLANTA SIN TRANSGENES CON UN PATRÓN DE METILACIÓN ALTERADO
- <130> FB20591
- <160> 28
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 635
- <212> DNA
- <213> Nicotiana tabacum

```

<400> 1
gtaaatttta cgttggaac ctattaactg tttacttgta agtttataga aggcttaacc      60
atctctggcc tggcttttta ctaatgctct aatccaaatt agtttcaaag atagtcaaat      120
tgattctegg gaagcaaaaa ggcacagagg gagtaattga ctgtctttcc ttaattagtt      180
aagattcaact tgtataatat ccccttctca tgagtcatga gatctaaagg catattgaaa      240
tacaagaag tctttctctc ctcccatat tctacactaa cttatgggag gaaatcattt      300
tctactggc tacgcaatta tccaacttgt aactctccag actaggtatg tatttcaact      360
gcctccctac ctctgaggca gaggtaatft gcgtacactc tactctctc agacctcact      420
ttgtggtatc ttactgggta tgtttttggt gtataattca tcagtacttc atctatctgg      480
aatattctca acttttgctc atggaagaat gtgttaactt tattaattgt tctttctagt      540
aaaagtgtaa aactagcttc cacccttctc aacgctttct atctttaatt cttttttatg      600
gcattgttac tcaagtgtta aaactttgat gacag                                     635
    
```

- <210> 2
- <211> 1433
- <212> DNA
- <213> sintético

```

<400> 2
atgaagacta atctttttct ctttctcacc ttttcaactc tccatcatt atctctggcc      60
gaattcagta aaggagaaga acttttcaact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat      120
ggatgatgta atgggtacaa attttctgtc agtggagagg gtgaaggtga tgaacatac      180
ggaaactta cccttaaatt tatttgcact actggaaaac tacctgttcc atggccaaca      240
cttgtcacta cttctcttta tgggtgttcaa tgccttttcaa gataccaga tcatatgaag      300
cggcacgact tcttcaagag cggcatgcct gagggatcg tgcaggtaaa ttttacgttg      360
gaaacctatt aactgtttac ttgtaagttt ctagaaggct taaccatttc ttgectggtc      420
tttactaat gctataatcc aaattagttt caaagatagt caaattgatt ctgggaagc      480
    
```

aaaaagcagc agagggagta attgactgtc tttccttaat tagttaagat tgccttgtat 540
 aatatcccc tctcatgagt catgagatct aaaggcatat tgaatacaa agaagctctt 600
 tcttccctcc catattctac actaacttat gggaggaaat cattttccta ctggctacgc 660
 aattattcaa cttgtaactc tccagactag gtatgtatct caactgcctc cctacctctg 720
 aggcagaggt aatttgcgta cactctactc tctcagacc tcaactttgtg gtatcttact 780
 gggatgtctt tggctgtata attcactcagt acttcateta tctggaatat tctcaacttt 840
 tgttcatgga agaatgtgtt aactttatta attgttcttt ctagtaaaag tgtaaaacta 900
 gcttccacc cttgtcaacgc tttctatctt taattctttt ttatggcatt gttactcaag 960
 tgttaaaact ttgatgacag gagaggacca tcttcttcaa ggacgacggg aactacaaga 1020
 cacgtgctga agtcaagttt gagggagaca cctctgtcaa caggatcgag cttaggggaa 1080
 tcgatttcaa ggaggacgga aacatcctcg gccacaagtt ggaatacaac tacaactccc 1140
 acaacgtata catcatggcc gacaagcaaa agaacggcat caaagccaac tcaagacc 1200
 gccacaacat cgaagacggc ggcgtgcaac tgcctgaca ttatcaaaa aatactcaa 1260
 ttggcgatgg cctgtcctt ttaccagaca accattacct gtccacaaa tctgccctt 1320
 cgaaagatcc caacgaaaag agagaccaca tggctcttct tgagtgtgta acagctgctg 1380
 ggattacaca tggcatggat gaactatata aacatgatga gctcaatcac tag 1433

<210> 3
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> Virus de la hoja amarilla y enrollada del Cestrum

<400> 3
 gatcctggca gacaagtggt cagacatact gtcccacaaa tgaagatgga atctgtaaaa 60
 gaaaacgcgt gaaataatgc gtctgacaaa ggttaggtcg gctgccttta atcaatacca 120
 aagtggctcc taccacgatg gaaaaactgt gcagtcggtt tggcttttct tgacgaacaa 180
 ataagattcg tggccgacag gtgggggtcc accatgtgaa ggcattctca gactocaata 240
 atggagcaat gacgtaaggc cttacgaaat aagtaagggt agtttgggaa atgtccactc 300
 acccgtcagt ctataaatac ttagccctc cctcattgtt aagggagcaa aatctcagag 360
 agatagtcct agagagagaa agagagcaag tagcctagaa gtaggac 408

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> sintético

<400> 4
 gatacgtgca gctgaggacc atc 23

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> sintético

 <400> 5
 gatacggagt cyagaggacc atc 23

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> sintético

 <400> 6
 tacgtaaatt ttacgttggg aac 23

<210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> sintético

 <400> 7
 gtaagtttct agaaggotta acc 23

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> sintético

 <400> 8
 catgagtcac gagatctaaa ggc 23

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> sintético

 <400> 9
 gtgttaaac tttgatgaca gctg 24

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> sintético

 <400> 10
 agatctgacg aacaaataag a 21

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> sintético

 <400> 11
 gaacaaatag gatccgtggc c 21

<210> 12		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 12		
ttctagagat cctactta		18
<210> 13		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 13		
ttctagagat cttacttcta		20
<210> 14		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 14		
gtagatctac gcagccgctt t		21
<210> 15		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 15		
tgttagccta gggcttta		18
<210> 16		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 16		
gccgccaaag atctgatg		18
<210> 17		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 17		
cgtcctgcag ttcattca		18
<210> 18		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 18		
tctctagaag cttgtcga		18

<210> 19		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 19		
tgtccagatc tcccaqta		18
<210> 20		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 20		
gtgaaataat gytgtgaya aaggttag		28
<210> 21		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 21		
acatttccca aactaccctt acttatttc		29
<210> 22		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 22		
gtaytaytt tytyttatgg tgttysatg		29
<210> 23		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 23		
tetataaata cttaacccct cctcatt		28
<210> 24		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 24		
gaatyaattt gaytatyttt gaaayta		27
<210> 25		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> sintético		
<400> 25		
aatratttc tccataart tarrta		27

ES 2 398 136 T3

<210> 26
 <211> 963
 <212> DNA
 <213> sintético

<400> 26
 tgtgggcatt cagtctggat cgcgaaaact gtggaattga tcagcgttg tgggaaagcg 60
 cgttacaaga aagccgggca attgctgtgc caggcagttt taacgatcag ttccgccgatg 120
 cagatattcg taattatgcg ggcaacgtct ggtatcagcg cgaagtcctt ataccgaaag 180
 gttgggcagg ccagcgtatc gtgctgcggt tegatgcggk cactcattac ggcaaaagtgt 240
 gggtaataa tcagggaagtg atggagcacc agggcggcta tacgccattt gaagccgatg 300
 tcaagccgta tgttattgac gggaaaagtg tacgtatcac cgtttgtgtg aadaacgaac 360
 tgaactggca gactatcccg ccgggaatgg tgattacoga cgaaaacggc aagaaaaagc 420
 agtccttactt ccattgattc ttttaactatg ccggaaacca tcgcagcgtg atgctctaca 480
 ccacgccgaa cacctgggtg gacgatatca ccgtgggtgac gcattgtcgg caagactgta 540
 accacggctc tgttgactgg caggtgggtg ccaatgggtg tgcagcgtt gaactgcgtg 600
 atgcggatca acaggtgggt gcaactggac aaggcactag cgggactttg caagtgggtg 660
 atccgcacct ctggcaaccg ggtgaaggtt atctctatga actgtgcgtc acagccaaaa 720
 gccagacaga gtgtgatata taccgccttc gcgtcggcat ccggtcagtg gcagtgaagg 780
 gcgaacagtt cctgattaac cacaaaaccg tctactttac tggctttggt cgtcatgaag 840
 atgcggactt gcgtggcaaa ggattcgata acgtgctgat ggtgcaccac cagcattaa 900
 tggactggat tggggccaac tectaccgta cctcgcakta cccttacgct gaagagatgc 960
 tcg 963

<210> 27
 <211> 792
 <212> DNA
 <213> sintético

<400> 27
 atgaagacta atctttttct ctttctcact tttcacttc tctatcatt atcctcggcc 60
 gaattcagta aaggagaaga acttttcact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat 120
 ggtgatgta atgggtacaa atttctgtc agtggagagg gtgaaggtga tgcaacatac 180
 ggaaaactta cccttaaat tatttgcact actggaaaac tccctgttcc atggccaaca 240
 ctgtcacta ctttctctta tgggtttcaa tgcctttcaa gataccaga tcatatgaag 300
 cggcaccgact tcttcaagag cggcatgctt gagggatccg tgcaggagag gaccatcttc 360
 ttcaaggacg acgggaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaggg agacaccctc 420
 gtcaacagga tccagcttaa gggaatcgtt ttcaaggagg acggaaacat cctcggccac 480

aagttggaat acaactecaa ctcccacaac gtatacatca tggccgacaa gcaaaagaac 540
 ggcatcaaag ccaacttcaa gacccgccac aacatcgaag acgggggggt gcaactcgct 600
 gatcattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttaac agacaacat 660
 tacctgtcca cacaaatctc cctttcgaaa gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc 720
 cttcttgagt ttgtaacagc tgctgggatt acacatggca tggatgaact atacaaacat 780
 gatgagcttt aa 792

<210> 28
 <211> 590
 <212> DNA
 <213> Virus de la hoja amarilla y enrollada del Cestrum

<400> 28
 tctagagatc ctactctag gctacttgct ctctttctct ctctaggact atctctctga 60
 gattttgctc ccttaacaat gagggagggg ctaagtattt atagactgac gggtgagtgg 120
 acatttccca aactaccctt acttatttcg taagccctta cgtcattgct ccattattgg 180
 agtctgaaga tgccttcaca tggtggaacc ccacctgtcg gccacgaate ttatttgctc 240
 gtcagatcct aactaattaa ggaagacag tcaattactc cctctgtcgc tttttgcttc 300
 ccgagaatca atttgactat ctttgaact aatttggatt agagcattag taaaagacca 360
 ggcaagatcc gtggccgaca ggtgggggtc caccatgtga aggcattctc agactccaat 420
 aatggagcaa tgacgtaagg gcttacgaaa taagtaaggg tagtttggga aatgtccact 480
 caccctcag tctataaata cttagccctt cctctattgt taaggagca aaatctcaga 540
 gagatgtcc tagagagaga aagagagcaa gtagcctaga agtaagatct 590

REIVINDICACIONES

1. Un método para modificar el patrón de metilación de una secuencia diana de DNA de una célula vegetal, que comprende los siguientes pasos:
 - 5 a) proporcionar un polinucleótido adecuado para la inducción de la metilación de DNA dirigida por RNA en dicha célula vegetal, comprendiendo dicho polinucleótido una secuencia que es complementaria a dicha secuencia diana de DNA de la citada célula vegetal y que está insertada en un intrón vegetal,
 - b) introducción de dicho polinucleótido en dicha célula vegetal,
 - 10 c) expresión de dicho polinucleótido en dicha célula transformada, induciendo así la metilación de DNA dirigida por RNA, y
 - d) determinación del patrón de metilación de dicha secuencia diana de DNA en dichas células transformadas de la planta.
2. Un método para producir una planta sin transgén con un patrón de metilación alterado en una secuencia diana de DNA de la misma, que comprende los siguientes pasos:
 - 15 a) proporcionar un polinucleótido adecuado para la inducción de la metilación de DNA dirigida por RNA en dicha planta, dicho polinucleótido comprendiendo una secuencia que es complementaria a dicha secuencia diana de DNA,
 - b) introducción de dicho polinucleótido en células de una planta,
 - 20 c) expresión de dicho polinucleótido en dichas células transformadas, induciendo así la metilación de DNA dirigida por RNA,
 - d) determinación del patrón de metilación de dicha secuencia diana de DNA en dichas células transformadas de la planta,
 - e) selección y autocruzamiento de una planta transformada que presenta un patrón de metilación alterado en dicha secuencia diana de DNA, y
 - 25 f) selección de una planta de la descendencia del cruce de e) que se caracteriza por carecer del citado polinucleótido introducido con arreglo al paso b).
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho polinucleótido codifica un dsRNA, preferiblemente una horquilla de dsRNA que está codificada por secuencias con sentido y antisentido contiguas que están separadas por un espaciador.
- 30 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en el que dicho polinucleótido está insertado en un intrón vegetal.
5. El método según la reivindicación 4, en el que dicho intrón vegetal comprende un sitio de ajuste GT cinco prima y un sitio de ajuste AG tres prima, y además tiene, antes de la inserción de cualquier secuencia adicional, un tamaño final aproximado de al menos 70 pares de bases.
- 35 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que dicho polinucleótido está enlazado funcionalmente a un promotor y a un sitio de poliadenilación, en el que dicho promotor se caracteriza porque es funcional en dicha célula de dicha planta.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha secuencia diana de DNA vegetal es una secuencia reguladora endógena que regula la transcripción del DNA vegetal, preferiblemente seleccionada entre, aunque no limitada a, secuencias promotoras endógenas, intensificadores, silenciadores, límites exón-intrón, UTR cinco prima, UTR tres prima, o aislantes.
- 40 8. Un método para la producción de una planta sin transgén que presenta un perfil de expresión génica alterado en un gen diana, comprendiendo un método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, y g) determinación de la expresión génica de dicho gen diana.
- 45 9. Uso de una planta producida con arreglo a un método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 para la producción de semillas, frutos, tallos, raíces y hojas u otros productos derivados de la planta con una expresión reducida de un gen, preferiblemente un gen que codifica un producto que es dañino para animales, seres humanos o plantas, preferiblemente genes que codifiquen alérgenos o genes que influyan en el nivel de sustancias bioquímicas venenosas de una planta, o un gen que codifique un rasgo indeseado como por

ejemplo un gen implicado en la aparición de la sobremaduración.

Figura 1

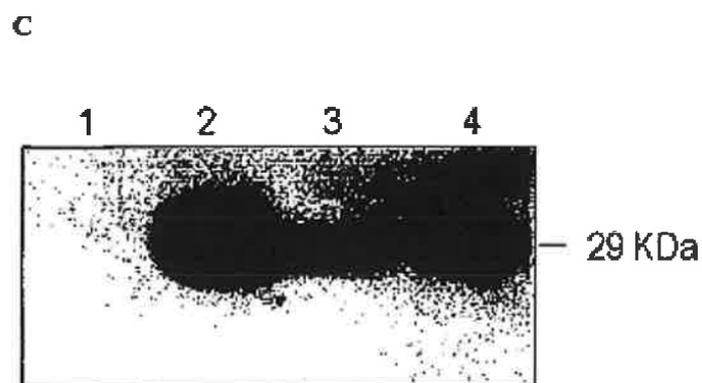
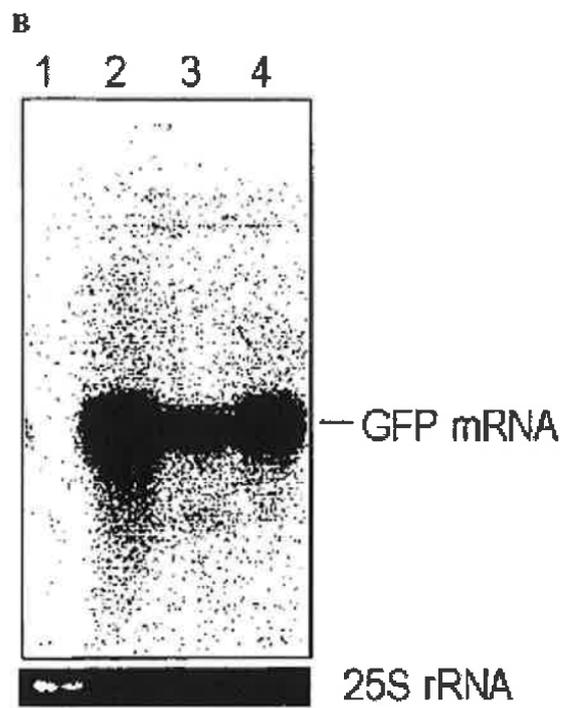


Figura 2

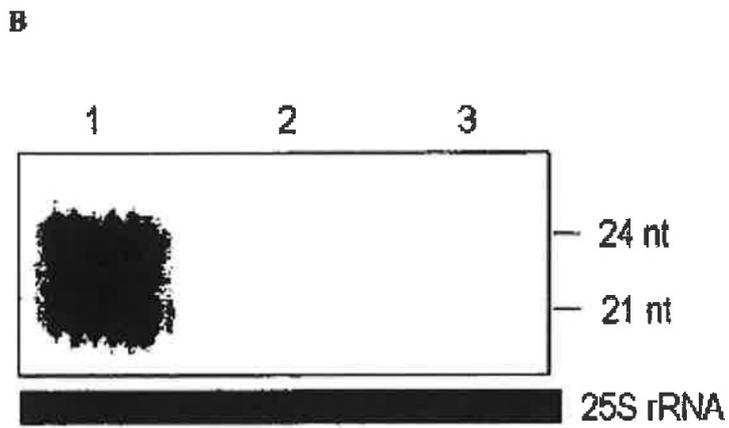
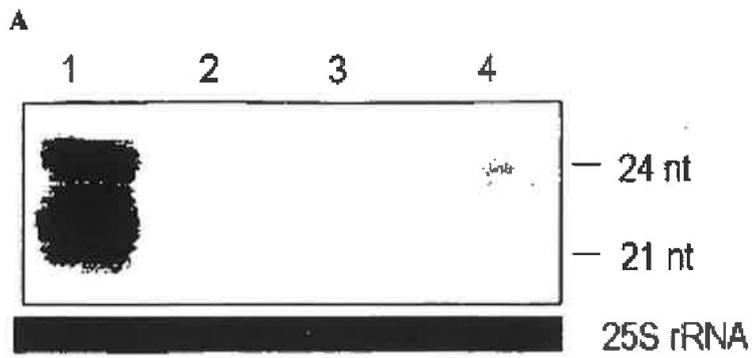
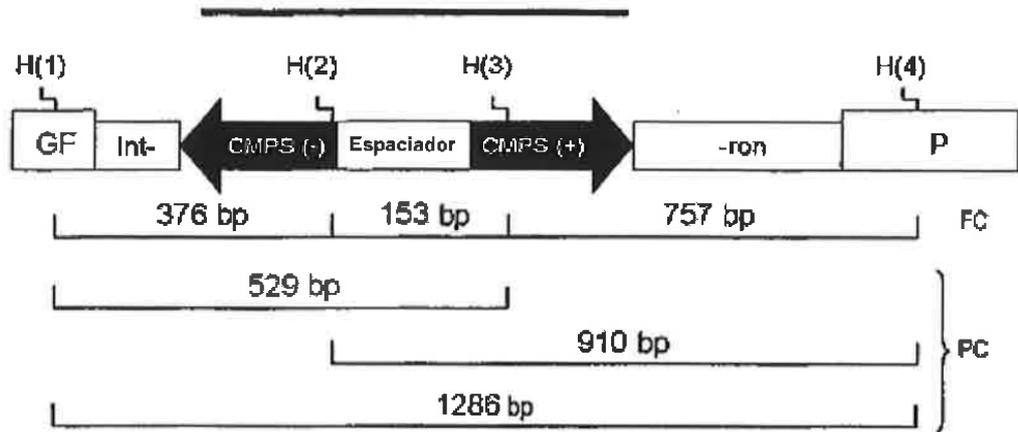


Figura 3

A



B

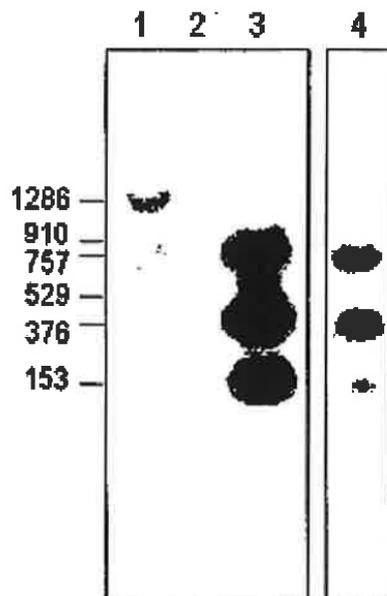


Figura 4

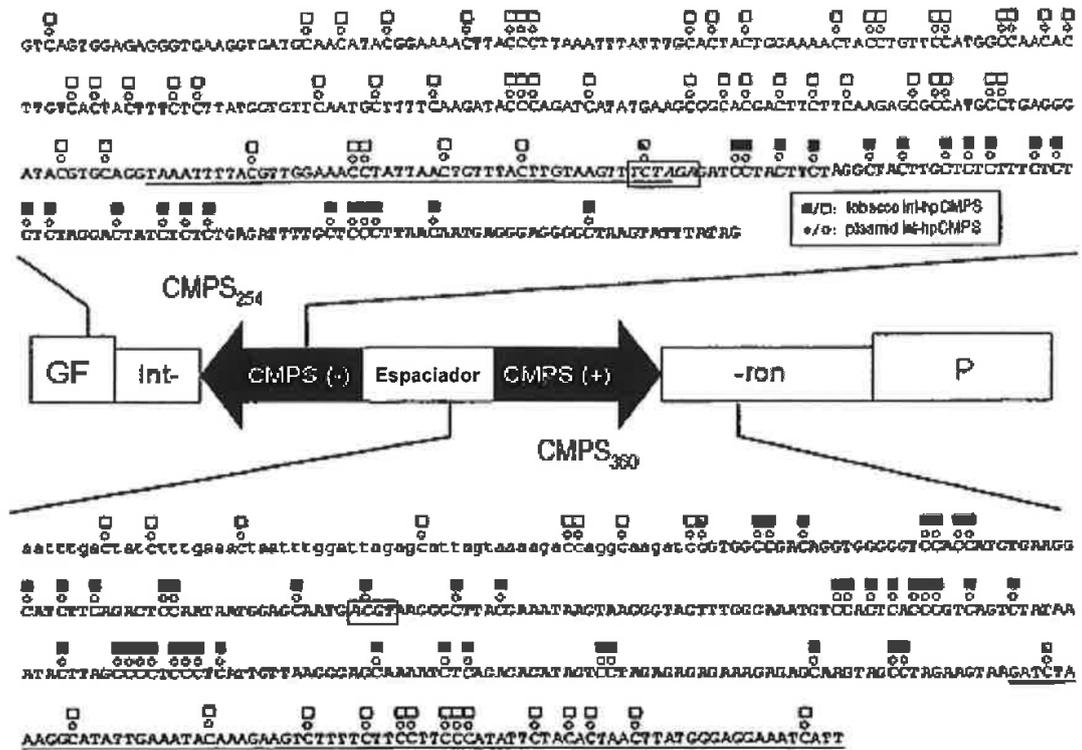
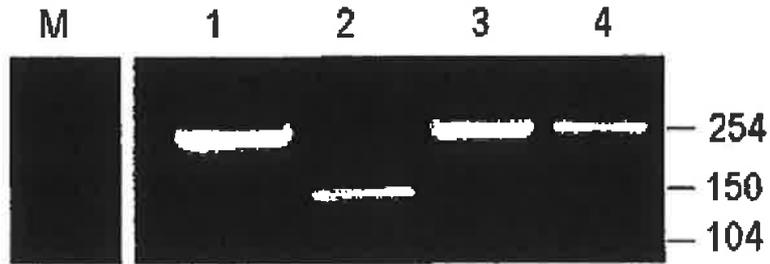


Figura 5

A



B

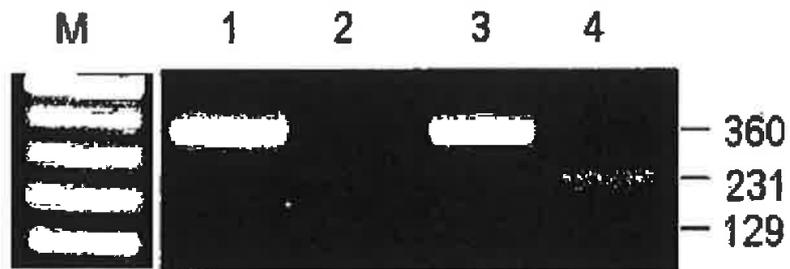


Figura 6

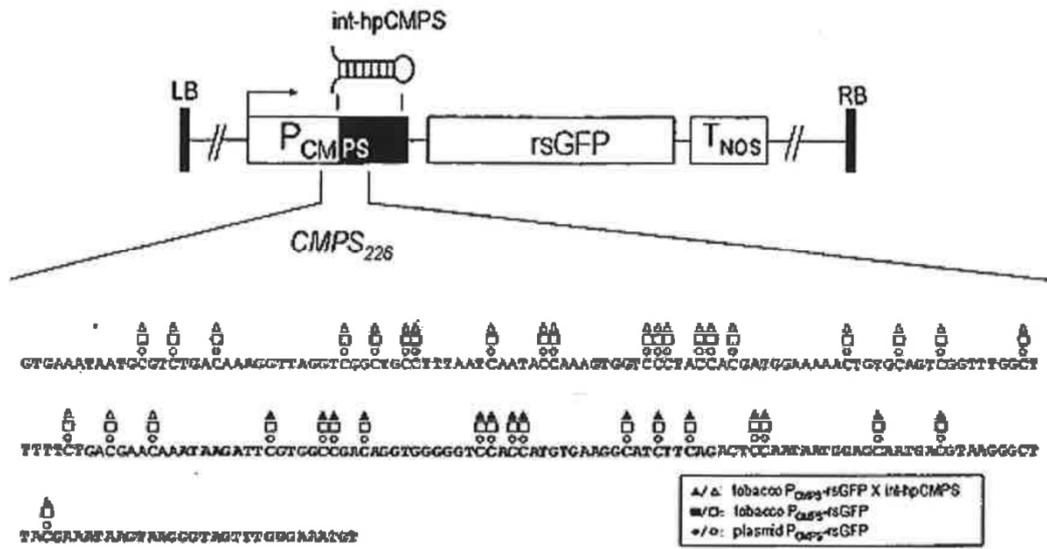


Figura 7

