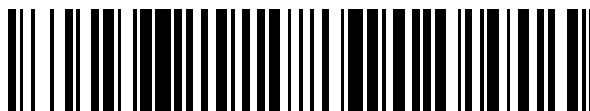


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 031**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2008 E 12156244 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 2458010**

54 Título: **Regulación decreciente de la expresión génica utilizando microRNAs artificiales**

30 Prioridad:

18.12.2007 US 14512 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.08.2013

73 Titular/es:

**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(100.0%)
1007 N. Market Street
Wilmington, DE 19898, US**

72 Inventor/es:

MCGONIGLE, BRIAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 421 031 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 decreciente de la expresión génica utilizando microRNAs artificiales

Campo De La Invención

5 El campo de la presente invención se refiere, en general, a la biología molecular de las plantas. En particular, la invención se refiere a constructos y métodos para regular en sentido decreciente la expresión de secuencias direccionadas.

Antecedentes

10 Los microRNAs (miRNAs) fueron identificados por primera vez hace sólo unos cuantos años, pero ya está claro que juegan un papel importante en la regulación de la actividad génica. Estos RNAs no codificantes de 20-22 nucleótidos tienen la capacidad de hibridarse por apareamiento de bases con mRNAs diana específicos y regular en sentido decreciente la expresión de estos transcritos, por medio de de la escisión del RNA o de la represión traduccional.

15 Estudios recientes han indicado que los miRNAs tienen funciones importantes durante el desarrollo. En las plantas, se ha demostrado que los mismos controlan una diversidad de procesos del desarrollo que incluyen el tiempo de floración, la morfología de las hojas, la polaridad de los órganos, la morfología floral, y el desarrollo de las raíces (revisado por Mallory y Vaucheret (2006) *Nat Genet* 38: S31-36). Dado el papel regulador establecido de los miRNAs, es probable que los mismos estén implicados también en el control de algunos de los rasgos principales de las cosechas tales como la tolerancia a la sequía y la resistencia a las enfermedades.

20 Los miRNAs son transcritos por la RNA-polimerasa II como mensajes poliadenilados y protegidos terminalmente conocidos como pri-miRNAs. Estos pri-miRNAs se procesan en transcritos de menor tamaño conocidos como pre-miRNAs, y estos precursores tienen la capacidad de formar estructuras estables en horquilla (revisado por Bartel (2004) *Cell* 116: 281-297; Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2006; 57: 19-53). Mientras que los pro-miRNAs son procesados a pre-miRNAs por Droscha en el núcleo y Dicer escinde los pre-miRNAs en el citoplasma de los metazoos, la maduración del miRNA en las plantas difiere del camino en los animales debido a que las plantas carecen de un homólogo de Droscha. En su lugar, la enzima RNasa III DICER-LIKE 1 (DCL1), que es homóloga a la Dicer animal, puede poseer la función de Droscha además de su conocida función en el procesamiento de la horquilla (Kurihara y Watanabe (2004) *Proc Natl Acad Sci* 101: 12753-12758).

30 Los microRNAs artificiales (amiRNAs) han sido descritos recientemente en secuencias de Arabidopsis direccionadas contra mRNA viral (Niu et al. (2006) *Nature Biotechnology* 24: 1420-1428) o genes endógenos (Schwab et al. (2006) *Plant Cell* 18: 1121-1133). El constructo amiRNA puede expresarse en promotores diferentes a fin de cambiar el modelo espacial de silenciación (Schwab et al. (2006) *Plant Cell* 18: 1121-1133). Los miRNAs artificiales reemplazan el microRNA y su secuencia estrella complementaria en un miRNA precursor y sustituyen secuencias que están direccionadas a un mRNA a silenciar. La silenciación por miRNAs endógenos puede encontrarse en una diversidad de patrones de expresión espaciales, temporales y del desarrollo (Parizotto et al. (2007) *Genes Dev* 18: 2237-2242; Álvarez et al. (2006) *Plant Cell* 18: 1134-51). El miRNA artificial puede construirse para capturar y extender a la vez la diversidad y especificidad en los patrones de silenciación. Hasta la fecha no existe informe alguno de la utilización de amiRNAs en plantas de cosecha.

35 WO 2004/009779 publicado el 29 de enero de 2004 describe composiciones y métodos para modular la expresión génica en plantas.

40 La Publicación de Solicitud de Patente US 2005/0138689 del Cesionario de la Solicitante y publicada el 23 de junio de 2005 describe miRNAs y su uso en la silenciación de una secuencia diana.

Breve Descripción Del Listado Se Secuencias

La invención puede comprenderse más plenamente a partir de la descripción detallada siguiente y el Listado de Secuencias que se acompaña, que forman parte de esta solicitud.

45 Las descripciones de secuencia resumen el Listado de Secuencias que se adjunta. El Listado de Secuencias contiene códigos de una sola letra para los caracteres de secuencia de los nucleótidos y códigos de una sola letra y de tres letras para los aminoácidos como se definen en los estándares de la IUPAC-IUB descritos en *Nucleic Acids Research* 13: 3021-3030 (1985) y en el *Biochemical Journal* 219 (2): 345-373 (1984).

50 SEQ ID NOs: 1-12 corresponden a iniciadores útiles para amplificación de precursores de microRNA (miRNA) genómicos de soja.

SEQ ID NOs: 13-18 corresponden a secuencias precursoras de miRNA de soja para 156c, 159, 166b, 168c, 396b y 398b, respectivamente.

SEQ ID NOs: 19-21 corresponde a la secuencia artificial de miRNA (amiRNA) utilizada para silenciar los transcritos de lipoxigenasa (lox) de soja, desaturasa de ácidos grasos 2-1 (fad 2-1), o la desaturasa de ácidos grasos 2-2 (fad 2-2), respectivamente.

5 SEQ ID NOs: 22-30 corresponden a "secuencias estrella" contenidas en precursores de amiRNA para 156c-lox, 159-lox, 166b-lox, 168c-lox, 398b-lox, 159-fad2-1b, 166b-fad2-1b, 396b-fad2-1b, y 159-fad2-2, respectivamente. Las secuencias estrella son las secuencias en gran parte complementarias dentro del precursor de miRNA que forman un dúplex con el miRNA.

10 SEQ ID NOs: 31-39 corresponden a precursores de amiRNA para 156c-lox, 159-lox, 166b-lox, 168c-lox, 398b-lox, 159-fad2-1b, 166b-fad2-1b, 396b-fad2-1b, and 159-fad2-2, respectivamente. Estos precursores, cuando se expresan en soja, dirigen la silenciación de los transcritos endógenos lox, fad 2-1, o fad 2-2.

SEQ ID NOs: 40-42 corresponden a la secuencia de amiRNA direccionada a fatB, una secuencia de tioesterasa de soja, y las secuencias estrella correspondientes para los precursores 159 y 396b, respectivamente.

15 SEQ ID NOs: 43-46 corresponden a cuatro versiones (a-d) de secuencias de amiRNA direccionadas a fosfoglucomutasa de soja, respectivamente. Precursores que contienen estas secuencias estrella son 159-PGMa, 168c-PGMb, 159-PGMc, y 159-PGMd, respectivamente. Precursores que contienen estas secuencias estrella son 159-PGMa, 168c-PGMb, 159-PGMc, y 159-PGMd, respectivamente.

Sumario De La Invención

20 La presente descripción se refiere a un fragmento de ácido nucleico aislado que comprende un miRNA precursor, correspondiendo sustancialmente dicho miRNA precursor a la secuencia de desoxirribonucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 13 (i) en donde los nucleótidos 513 a 533 de SEQ ID NO: 13 están reemplazados por una primera subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos dependiendo de la secuencia diana cuya expresión debe reducirse y (ii) en donde adicionalmente los nucleótidos 384 a 407 de SEQ ID NO: 13 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos, siendo dicha segunda subsecuencia variable de nucleótidos capaz de hibridarse a la primera subsecuencia variable del miRNA precursor.

Otros fragmentos nucleicos aislados que son de interés también incluyen los siguientes:

30 a) un fragmento de ácido nucleico aislado que comprende un miRNA precursor, correspondiendo sustancialmente dicho miRNA precursor a la secuencia de desoxirribonucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 14 (i) en donde los nucleótidos 275 a 295 de SEQ ID NO: 14 están reemplazados por una primera subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos dependiendo de la secuencia diana cuya expresión debe reducirse y (ii) en donde adicionalmente los nucleótidos 121 a 141 de SEQ ID NO: 14 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos, siendo dicha segunda subsecuencia variable de nucleótidos capaz de hibridarse a la primera subsecuencia variable del miRNA precursor;

35 b) un fragmento de ácido nucleico aislado que comprende un miRNA precursor, correspondiendo sustancialmente dicho miRNA precursor a la secuencia de desoxirribonucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 15 (i) en donde los nucleótidos 262 a 282 de SEQ ID NO: 15 están reemplazados por una primera subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos dependiendo de la secuencia diana cuya expresión debe reducirse y (ii) en donde adicionalmente los nucleótidos 155 a 175 de SEQ ID NO: 15 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos, siendo dicha segunda subsecuencia variable de nucleótidos capaz de hibridarse a la primera subsecuencia variable del miRNA precursor;

45 c) un fragmento de ácido nucleico aislado que comprende un miRNA precursor, correspondiendo sustancialmente dicho miRNA precursor a la secuencia de desoxirribonucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 16 (i) en donde los nucleótidos 249 a 269 de SEQ ID NO: 16 están reemplazados por una primera subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos dependiendo de la secuencia diana cuya expresión debe reducirse y (ii) y en donde adicionalmente los nucleótidos 316 a 336 de SEQ ID NO: 16 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos, siendo dicha segunda subsecuencia variable de nucleótidos capaz de hibridarse a la primera subsecuencia variable del miRNA precursor;

50 d) un fragmento de ácido nucleico aislado que comprende un miRNA precursor, correspondiendo sustancialmente dicho miRNA precursor a la secuencia de desoxirribonucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 17 (i) en donde los nucleótidos 196 a 216 de SEQ ID NO: 17 están reemplazados por una primera subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos dependiendo de la secuencia diana cuya expresión debe reducirse y (ii) y en donde adicionalmente los nucleótidos 262 a 282 de SEQ ID NO: 17 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre

aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos, siendo dicha segunda subsecuencia variable de nucleótidos capaz de hibridarse a la primera subsecuencia variable del miRNA precursor; y

e) un fragmento de ácido nucleico aislado que comprende un miRNA precursor, correspondiendo sustancialmente dicho miRNA precursor a la secuencia de desoxirribonucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 18 (i) en donde los nucleótidos 127 a 147 de SEQ ID NO: 18 están reemplazados por una primera subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos dependiendo de la secuencia diana cuya expresión debe reducirse, y (ii) en donde adicionalmente los nucleótidos 53 a 73 de SEQ ID NO: 18 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 nucleótidos, siendo dicha segunda subsecuencia variable de nucleótidos capaz de hibridarse a la primera subsecuencia variable del miRNA precursor.

Cualquiera de estos fragmentos de ácido nucleico aislados puede utilizarse para producir un constructo recombinante que comprende estos fragmentos de ácido nucleico aislados enlazados operativamente a al menos una secuencia reguladora.

Estos constructos pueden transformarse en células vegetales de tal modo que la célula vegetal transformada comprende el constructo recombinante en su genoma.

En otro aspecto, esta descripción se refiere a un método para reducir la expresión de un gen diana en una célula vegetal, comprendiendo dicho método:

(a) transformar al menos una célula vegetal con un constructo de ácido nucleico que comprende cualquiera de los fragmentos de ácido nucleico aislados descritos en esta memoria; y

(b) seleccionar aquella o aquellas células vegetales transformadas cuyo nivel de expresión de la secuencia diana es reducido en comparación con el nivel de expresión del gen diana en una célula vegetal de tipo salvaje.

Descripción Detallada

Como se utiliza en esta memoria y en las reivindicaciones del apéndice, las formas singulares "un", "uno" "una", y "el" incluyen las referencias plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "una planta" incluye una pluralidad de tales plantas, la referencia a "una célula" incluye una o más células y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, etcétera.

En el contexto de esta descripción, se utilizan varios términos y abreviaturas. Se proporcionan las definiciones siguientes.

"MicroRNA o miRNA" se refiere a ácido oligorribonucleico, que regula la expresión de un polinucleótido que comprende la secuencia diana. Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes de aproximadamente 19 a aproximadamente 24 nucleótidos (nt) de longitud, que han sido identificados tanto en animales como en plantas (Lagos-Quintana et al., *Science* 294: 853-858, 2001; Lagos-Quintana et al., *Curr. Biol.* 12:735-739, 2002; Lau et al., *Science* 294:858-862, 2001; Lee y Ambros, *Science* 294:862-864 2001; Llave et al., *Plant Cell* 14:1605-1619, 2002; Mourelatos et al., *Genes. Dev.* 16:720-728, 2002; Park et al., *Curr. Biol.* 12:1484-1495, 2002; Reinhart et al., *Genes. Dev.* 16:1616-1626, 2002) que regula la expresión de un polinucleótido que comprende la secuencia diana. Los mismos son procesados a partir de transcritos precursores más largos de un tamaño comprendido entre aproximadamente 70 y 2000 nt o mayor, y estos transcritos precursores tienen capacidad para formar estructuras estables en horquilla. En los animales, la enzima implicada en el procesamiento de los precursores de miRNA se denomina Dicer, una proteína semejante a la RNAsa III (Grishok et al., *Cell* 106:23-34, 2001; Hutvagner et al., *Science* 293:834-838, 2001; Ketting et al., *Genes. Dev.* 15:2654-2659, 2001). Las plantas tienen también una enzima semejante a Dicer, DCL1 (designada con anterioridad CARPEL FACTORY/SHORT INTEGUMENTS1/SUSPENSOR1) y evidencia reciente indican que la misma, al igual que Dicer, está implicada en el procesamiento de los precursores en horquilla para generar miRNAs maduros (Park et al., *Curr. Biol.* 12:1484-1495, 2002; Reinhart et al., *Genes. Dev.* 16:1616-1626. 2002).

Adicionalmente, está resultando claro por un trabajo reciente que al menos algunos precursores de miRNA en horquilla se originan como transcritos poliadenilados de mayor longitud, y varios miRNAs diferentes y horquillas asociadas pueden estar presentes en un solo transcrito (Lagos-Quintana et al., *Science* 294:853-858, 2001; Lee et al., *EMBO J* 21:4663-4670 2002). Un trabajo reciente ha examinado también la selección de la cadena de miRNA del producto dsRNA originado por el procesamiento de la horquilla por Dicer (Schwartz et al., 2003, *Cell* 115: 199-208). Parece ser que la estabilidad (es decir el contenido de G:C frente a A:U, y/o apareamientos erróneos) de los dos extremos del dsRNA procesado afecta a la selección de la cadena, siendo el extremo de estabilidad baja más fácil de desenrollar por una actividad de helicasa. La cadena del extremo 5' en el extremo de estabilidad baja se incorpora en el complejo RISC, mientras que la otra cadena se degrada.

Los "pri-miRNAs" o "miRNAs primarios" son RNAs largos poliadenilados transcritos por la RNA-polimerasa II que codifican miRNAs. Los "pre-miRNAs" son miRNAs primarios que han sido procesados para formar una secuencia más corta que tiene la capacidad de formar una horquilla estable y se procesa ulteriormente para liberar un miRNA.

En las plantas, ambos pasos de procesamiento son realizados por Dicer-like y por esta razón es difícil diferenciar funcionalmente entre "pri-miRNAs" y "pre-miRNAs". Por tanto, un miRNA precursor, o un miRNA primario, se define funcionalmente en esta memoria como una secuencia de nucleótidos que es capaz de producir un miRNA. Dada esta definición funcional, y como resultará claro por los ejemplos y la discusión expuesta en esta memoria, un miRNA precursor, miRNA primario y /o un miRNA de la invención puede representarse como un ácido ribonucleico o, alternativamente, en una forma de ácido desoxirribonucleico que "corresponde sustancialmente" al miRNA precursor, miRNA primario y/o miRNA. Se comprenderá que el DNA en su forma bicatenaria comprenderá una cadena capaz de transcribirse en el miRNA precursor descrito. Se describen constructos de expresión, constructos de RNA recombinante, y organismos transgénicos que incorporan el DNA codificante de miRNA que da como resultado la expresión de los precursores de miRNA descritos.

Una "subsecuencia variable de nucleótidos" se refiere a una porción de una secuencia de nucleótidos que reemplaza una porción de una secuencia de pre-miRNA con tal que esta subsecuencia sea diferente de la secuencia que se reemplaza, es decir, no puede tratarse de la misma secuencia.

Un "gen diana" se refiere a un gen que codifica un RNA diana, es decir, un gen del cual se transcribe un RNA diana. El gen puede codificar mRNA, tRNA, RNA pequeño, etc.

Una "secuencia diana" se refiere a un RNA cuya expresión debe modularse, v.g., regularse en sentido decreciente. La secuencia diana puede ser una porción de un marco de lectura abierto, región 5' o 3' no traducida, uno o más exones, uno o más intrones, región flanqueante, etc.

Una "secuencia estrella" es la secuencia complementaria dentro de un precursor de miRNA que forma un dúplex con el miRNA. La complementariedad de la secuencia estrella no precisa ser perfecta. Se encuentran a veces sustituciones no rompedoras de la hélice (es decir pares de bases G: T, etc), así como apareamientos 1-3 erróneos.

El término "genoma" se refiere a lo siguiente: (1) el complemento entero de material genético (genes y secuencias no codificantes) presente en cada célula de un organismo, o virus u orgánulo; (2) un conjunto completo de cromosomas heredados como una unidad (haploide) procedente de un solo parental.

"Progenie" comprende una generación subsiguiente de una planta. La progenie heredará, y segregará de manera estable, genes y transgenes de su o sus plantas parentales.

Las unidades, prefijos, y símbolos pueden designarse en su forma aceptada en el SI. A no ser que se indique otra cosa, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxilo, respectivamente. Los intervalos numéricos citados en la memoria descriptiva son inclusivos de los números que definen el intervalo e incluyen todos y cada uno de los números enteros comprendidos dentro del intervalo definido. Los aminoácidos pueden designarse en esta memoria por los símbolos de 3 letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una sola letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Análogamente, los nucleótidos pueden designarse por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados. A no ser que se estipule otra cosa, los términos de software, eléctricos y electrónicos que se utilizan en esta memoria son como se define en The New IEEE Standard Dictionary of Electrical and Electronics Terms (5ª edición, 1993). Los términos definidos más adelante se definen más completamente por referencia a la memoria descriptiva como un todo.

Los términos "constructo recombinante", "constructo de expresión", "constructo quimérico", "constructo" y "constructo de DNA recombinante" se utilizan intercambiabilmente en esta memoria. Un constructo recombinante comprende una combinación artificial de fragmentos de ácido nucleico, v.g., secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por ejemplo, un constructo quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se derivan de fuentes diferentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se derivan de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente de la encontrada en la naturaleza. Un constructo de este tipo puede utilizarse en sí mismo o puede utilizarse en conjunción con un vector. Si se utiliza un vector, entonces la elección del vector depende del método que se utilice para transformar las células hospedadoras como es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse un vector de plásmido. El profesional experto es perfectamente sabedor de los elementos genéticos que tienen que estar presentes en el vector a fin de transformar, seleccionar y propagar con éxito células hospedadoras que comprenden cualquiera de los fragmentos de ácido nucleico aislados de la invención. El profesional experto reconocerá también que sucesos de transformación diferentes independientes darán como resultado niveles y patrones de expresión diferentes (Jones et al., *EMBO J.* 4: 2411-2418 (1985); De Almeida et al., *Mol. Gen. Genetics* 218: 78-86 (1989)), y por tanto que deben cribarse sucesos múltiples a fin de obtener líneas que exhiban el nivel y el modelo de expresión deseados. Dicho cribado puede realizarse por análisis Southern de DNA, análisis Northern de la expresión del mRNA, análisis por inmunotransferencia de la expresión de proteínas, o análisis fenotípico, entre otros.

Este constructo puede comprender cualquier combinación de desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, y/o nucleótidos modificados. El constructo puede transcribirse para formar un RNA, en donde el RNA puede ser capaz de formar un RNA bicatenario y/o estructura de horquilla. Este constructo puede expresarse en la célula, o aislarse o producirse

sintéticamente. El constructo puede comprender adicionalmente un promotor, u otras secuencias que faciliten la manipulación o expresión del constructo.

5 Como se utilizan en esta memoria, "supresión", "silenciación" o "inhibición" se utilizan intercambiamente para designar la regulación decreciente de la expresión de un producto de una secuencia diana con relación a su nivel de expresión normal en un organismo de tipo salvaje. La supresión incluye una expresión que se reduce aproximadamente en un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% con relación al nivel de expresión del tipo salvaje.

Como se utiliza en esta memoria, "codifica" o "codificante" se refiere a una secuencia de DNA que puede procesarse para generar un RNA y/o polipéptido.

10 Como se utiliza en esta memoria, "expresión" o "que expresa" se refiere a la producción de un producto funcional, tal como la generación de un transcrito de RNA a partir de un constructo introducido, una secuencia de DNA endógena, o una secuencia de DNA heteróloga incorporada de manera estable. El término puede referirse también a un polipéptido producido a partir de un mRNA generado por cualquiera de los precursores del DNA anteriores. Así, la expresión de un fragmento de ácido nucleico puede referirse a la transcripción de un fragmento de ácido nucleico (v.g.,
15 una transcripción que dé como resultado mRNA u otro RNA funcional) y/o la traducción de RNA en un precursor o proteína madura (polipéptido).

20 Como se utiliza en esta memoria, "heteróloga" con respecto a la secuencia significa una secuencia que se origina a partir de una especie extraña, o, si procede de la misma especie, está modificada sustancialmente con respecto a su forma nativa en composición y/o locus genómico por intervención humana deliberada. Por ejemplo, con respecto a un ácido nucleico, el mismo puede ser un ácido nucleico que se origina de una especie extraña, o está diseñado sintéticamente, o, si procede de la misma especie, está modificado sustancialmente con respecto a su forma nativa en composición y/o locus genómico por intervención humana deliberada. Una proteína heteróloga puede originarse a partir de una especie extraña o, si procede de la misma especie, está modificada sustancialmente con respecto a su forma original por intervención humana deliberada.

25 El término "célula hospedadora" se refiere a una célula que contiene o en la cual se ha introducido un constructo de ácido nucleico y soporta la replicación y/o expresión del constructo. Las células hospedadoras pueden ser células procariontas tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de hongos, levaduras, insectos, anfibios, nematodos, o mamíferos. Alternativamente, las células hospedadoras son células de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas. Un ejemplo de una célula hospedadora monocotiledónea es una célula hospedadora de maíz.

30 "Planta" incluye referencia a plantas enteras, órganos de plantas, tejidos de plantas, semillas y células de plantas y progenie de las mismas. Las células de plantas incluyen, sin limitación, células de semillas, cultivos de suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen, y microporas.

35 El término "partes de plantas" incluye tejidos diferenciados y no diferenciados con inclusión, pero sin carácter limitante, de los siguientes: raíces, tallos, brotes, hojas, polen, semillas, tejido tumoral y diversas formas de células y cultivos (v.g., células aisladas, protoplastos, embriones y tejido de callo). El tejido de planta puede encontrarse en una planta o en un órgano, tejido o cultivo de células de la planta.

El término "órgano de la planta" se refiere a un tejido o grupo de tejidos de la planta que constituyen una parte morfológica y funcionalmente distinta de una planta.

40 El término "introducido" significa el aporte de un ácido nucleico (v.g., constructo de expresión) o proteína a una célula. Introducido incluye referencia a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota o procarionta en donde el ácido nucleico puede estar incorporado en el genoma de la célula, e incluye referencia al aporte transitorio de un ácido nucleico o proteína a la célula. Introducido incluye referencia a métodos de transformación estables o transitorios, así como cruzamiento sexual. Así, "introducido" en el contexto de la iniciación de un resto de ácido nucleico (v.g., un constructo de DNA recombinante/constructo de expresión) en una célula, significa "transfección" o
45 "transformación" o "transducción", e incluye referencia a la incorporación de un fragmento de ácido nucleico en una célula eucariota o procarionta en donde el fragmento de ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de la célula (v.g., cromosoma, plásmido, plástido o DNA mitocondrial), convertirse en un replicón autólogo, o expresarse de modo transitorio (v.g., mRNA transfectado).

50 El término "genoma" cuando se aplica a una célula vegetal abarca no sólo DNA cromosómico encontrado en el interior del núcleo, sino DNA orgánulos encontrado dentro de componentes subcelulares (v.g., mitocondrias, plástidos) de la célula.

55 El término "aislado" se refiere a un material, tal como un ácido nucleico o una proteína, que: (1) está sustancial o esencialmente exento de componentes que acompañan normalmente o interaccionan con el material tal como se encuentra en su entorno existente naturalmente, o (2) si el material se encuentra en su entorno natural, el material ha sido alterado por intervención humana deliberada para dar una composición y/o se ha dispuesto en un locus en la célula distinto del locus nativo para el material.

Como se utiliza en esta memoria, "dominio" o "dominio funcional" se refiere a una o más secuencias de ácido nucleico que son capaces de suscitar una respuesta biológica en las plantas. La presente invención se refiere a miRNAs compuestos de secuencias de al menos 21 nucleótidos que actúan individualmente, o en concierto con otras secuencias de miRNA, por consiguiente un dominio podría referirse a miRNAs individuales o grupos de miRNAs. Asimismo, las secuencias de miRNA asociadas con sus secuencias de cadena principal podrían considerarse dominios útiles para procesamiento del miRNA en su forma activa. Como se utiliza en esta memoria, "subdominios" o "subdominios funcionales" se refieren a sus secuencias de dominios que son capaces de suscitar una respuesta biológica en las plantas. Un miRNA podría considerarse como un subdominio de una secuencia de la cadena principal. Las secuencias o dominios "contiguos" se refieren a secuencias que están enlazadas secuencialmente sin nucleótidos añadidos interpuestos entre los dominios. Un ejemplo de un cadena contigua de dominio se encuentra en SEQ ID NO: 7957 que representa SEQ ID NOs: 1-2652 como una cadena continua que puede considerarse como 2652 secuencias de miRNA enlazadas en una concatenación secuencial.

La interferencia de RNA se refiere al proceso de silenciamiento en animales de genes específicos de secuencia posterior a la transcripción mediada por RNAs de interferencia cortos (siRNAs) (Fire et al., *Nature* 391: 806, 1998). El proceso correspondiente en las plantas se conoce comúnmente como silenciamiento de genes posterior a la transcripción (PTGS) o silenciamiento de RNA, y se hace referencia también al mismo como sofocación en los hongos. Se cree que el proceso de silenciamiento de genes posterior a la transcripción es un mecanismo celular de defensa conservado a lo largo de la evolución, utilizado para prevenir la expresión de genes extraños y es compartido comúnmente por flora y filums diversos (Fire et al., *Trends Genet.* 15: 358, 1999). Dicha protección contra la expresión de genes extraños puede haber evolucionado en respuesta a la producción de RNAs bicatenarios (dsRNAs) derivados de infección viral o de la integración aleatoria de elementos transposón en un genoma hospedador por una respuesta celular que destruye específicamente el RNA homólogo monocatenario del RNA genómico viral. La presencia de dsRNA en las células desencadena la respuesta de RNAi por un mecanismo que no está esclarecido todavía totalmente.

La presencia de dsRNAs largos en las células estimula la actividad de una enzima ribonucleasa III a la que se hace referencia como "Dicer". Dicer está implicada en el procesamiento del dsRNA en fragmentos cortos de dsRNA conocidos como RNAs de interferencia cortos (siRNAs) (Berstein et al., *Nature* 409: 363, 2001) y/o pre-miRNAs en miRNAs. Los RNAs de interferencia cortos derivados de la actividad de Dicer tienen típicamente una longitud de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos y comprenden dúplex de aproximadamente 19 pares de bases (Elbashir et al., *Genes Dev.* 15: 188, 2001). Dicer ha sido implicada también en la escisión de pequeños RNAs temporales (stRNAs) de 21 y 22 nucleótidos a partir de RNA precursor de estructura conservada que están implicados en el control de la traducción (Hutvagner et al., 2001, *Science* 293: 834). La respuesta de RNAi caracteriza también un complejo de endonucleasas, al que se hace referencia comúnmente como un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), que media la escisión de RNA monocatenario que tiene complementariedad de secuencia con la cadena antisentido del dúplex de siRNA. La escisión del RNA diana tiene lugar en el centro de la región complementaria a la cadena antisentido del dúplex de siRNA (Elbashir et al., *Genes Dev.* 15: 188, 2001). Adicionalmente, la interferencia de RNA puede implicar también silenciamiento de genes mediada por RNA pequeño (v.g., microRNA, o miRNA), presumiblemente por mecanismos celulares que regulan la estructura de la cromatina e impiden por ello la transcripción de secuencias de genes diana (véase, v.g., Allshire, *Science* 297:1818-1819, 2002; Volpe et al., *Science* 297:1833-1837, 2002; Jenuwein, *Science* 297:2215-2218, 2002; y Hall et al., *Science* 297:2232-2237, 2002). Como tales, las moléculas de miRNA de la invención pueden utilizarse para mediar la silenciamiento de genes por interacción con transcritos de RNA, o alternativamente por interacción con secuencias particulares de genes, en donde dicha interacción da como resultado la silenciamiento de genes sea al nivel de la transcripción o posterior a la transcripción.

El RNAi ha sido estudiado en una diversidad de sistemas. Fire et al. (*Nature* 391: 806, 1998) fueron los primeros en observar RNAi en *C. elegans*. Wianny y Goetz (*Nature Cell Biol.* 2: 70, 1999) describen RNAi mediado por dsRNA en embriones de ratón. Hammond et al. (*Nature* 404: 293, 2000) describen RNAi en células de *Drosophila* transfectadas con dsRNA. Elbashir et al., *Nature* 411: 494, 2001) describen RNAi inducido por introducción de dúplex de RNAs sintéticos de 21 nucleótidos en células de mamífero cultivadas con inclusión de células de riñón de embrión humano y células HeLa.

Los RNAs pequeños juegan un papel importante en el control de la expresión génica. La regulación de muchos procesos del desarrollo, con inclusión de la floración, está controlada por RNAs pequeños. Ahora es posible elaborar por ingeniería genética cambios en la expresión génica de genes de plantas por utilización de constructos transgénicos que producen RNAs pequeños en la planta.

Los RNAs pequeños parecen funcionar por apareamiento de bases a secuencias diana de RNA o DNA complementario. Cuando se fijan a RNA, los RNAs pequeños desencadenan la escisión del RNA o la inhibición de la traducción de la secuencia diana. Cuando se fijan a secuencias diana de DNA, se cree que los RNAs pequeños pueden mediar la metilación del DNA de la secuencia diana. La consecuencia de estos sucesos, con indiferencia del mecanismo específico, es que se inhibe la expresión génica.

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes de aproximadamente 19 a aproximadamente 24 nucleótidos (nt) de longitud que han sido identificados tanto en animales como en plantas (Lagos-Quintana et al., *Science* 294:853-858, 2001, Lagos-Quintana et al., *Curr. Biol.* 12:735-739, 2002; Lau et al., *Science* 294:858-862, 2001; Lee

y Ambros. *Science* 294:862-864, 2001; Llave et al., *Plant Cell* 14:1605-1619, 2002; Mourelatos et al., *Genes. Dev.* 16:720-728, 2002; Park et al., *Curr. Biol.* 12:1484-1495, 2002; Reinhart et al., *Genes. Dev.* 16:1616-1626, 2002). Los mismos se procesan a partir de transcritos precursores más largos que tienen un tamaño comprendido entre aproximadamente 70 y 200 nt, y estos transcritos precursores tienen la capacidad de formar estructuras de horquilla estables. En los animales, la enzima implicada en el procesamiento de los precursores de miRNA se denomina Dicer, una proteína de tipo RNasa III (Grishok et al., *Cell* 106:23-34, 2001; Hutvagner et al., *Science* 293:834-838, 2001; Ketting et al., *Genes. Dev.* 15:2654-2659, 2001). Las plantas tienen también una enzima semejante a Dicer, DCL1 (designada anteriormente CARPEL FACTORY/SHORT INTEGUMENTS1/SUSPENSOR1), y evidencia reciente indica que la misma, como Dicer, está implicada en el procesamiento de los precursores de horquilla para generar miRNAs maduros (Park et al., *Curr. Biol.* 12: 1484-1495, 2002); Reinhart et al., *Genes. Dev.* 16: 1616-1626, 2002). Adicionalmente, está esclareciéndose por trabajo reciente que al menos algunos precursores de horquilla de miRNA se originan como transcritos poliadenilados más largos, y varios miRNAs diferentes y horquillas asociadas pueden estar presentes en un solo transcrito (Lagos-Quintana et al., *Science* 294: 853-858, 2001; Lee et al., *EMBO J* 21: 4663-4670, 2002). Trabajos recientes han examinado también la selección de la cadena de miRNA a partir del producto dsRNA procedente del procesamiento de la horquilla por DICER (Schwartz et al., 2003, *Cell* 115: 199-208). Parece ser que la estabilidad (es decir el contenido de G: C frente a A: U, y/o apareamientos erróneos) de los dos extremos del dsRNA procesado afecta a la selección de la cadena, siendo el extremo de estabilidad baja más fácil de desenrollar por una actividad de helicasa. La cadena del extremo 5' en el extremo de estabilidad baja se incorpora en el complejo RISC, mientras que la otra cadena se degrada.

En los animales, existe evidencia directa que indica un papel para miRNAs específicos en el desarrollo. Se ha encontrado que los miRNAs lin-4 y let-7 en *C. elegans* controlan el desarrollo temporal, basándose en los fenotipos generados cuando se mutan los genes que producen los miRNAs lin-4 y let-7 (Lee et al., *Cell* 75: 843-854, 1993; Reinhart et al., *Nature*. 403:901-906, 2000). Adicionalmente, ambos miRNAs exhiben un patrón de expresión temporal consistente con sus funciones en la temporización del desarrollo. Otros miRNAs animales exhiben patrones de expresión regulados por el desarrollo, tanto temporales como específicos de tejido (Lagos-Quintana et al., *Science* 294: 853-853, 2001, Lagos-Quintana et al., *Curr. Biol.* 12: 735-739, 2002; Lau et al., *Science* 294: 858-862, 2001; Lee y Ambros, *Science* 294: 862-864, 2001), conduciendo a la hipótesis de que los miRNAs pueden, en muchos casos, estar implicados en la regulación de procesos importantes del desarrollo. Análogamente, en las plantas, los patrones de expresión diferencial de muchos miRNAs sugieren un papel en el desarrollo (Llave et al., *Plant Cell* 14: 1605-1619, 2002; Park et al., *Curr. Biol.* 12: 1484-1495, 2002; Reinhart et al., *Genes. Dev.* 16: 1616-1626, 2002). Sin embargo, no se ha demostrado directamente un papel de miRNAs en el desarrollo en las plantas, dado que hasta la fecha no se ha publicado informe alguno acerca de un fenotipo de desarrollo asociado con un miRNA de plantas específico.

Los microRNAs parecen regular genes diana por fijación a secuencias complementarias localizadas en los transcritos producidos por estos genes. En el caso de lin-4 y let-7, los sitios diana están localizados en las UTRs 3' de los mRNAs diana (Lee et al. *Cell* 75: 843-854, 1993; Wightman et al., *Cell* 75:855-862, 1993; Reinhart et al., *Nature* 403:901-906, 2000; Slack et al., *Mol. Cell* 5:659-669, 2000), y existen varios apareamientos erróneos entre los miRNAs lin-4 y let-7 y sus sitios diana. La fijación del miRNA lin-4 o let-7 parece causar regulación decreciente de los niveles en estado estacionario de la proteína codificada por el mRNA diana sin afectar al transcrito propiamente dicho (Olsen y Ambros, *Dev. Biol.* 216: 671-680, 1999). Por otra parte, pruebas recientes sugieren que los miRNAs pueden, en algunos casos, causar escisión específica del RNA del transcrito diana dentro del sitio diana (Hutvagner y Zamore, *Science* 297:2056-2060, 2002; Llave et al., *Plant Cell* 14:1605-1619, 2002). Parece probable que los miRNAs pueden intervenir al menos en dos caminos de regulación de genes diana: la regulación decreciente de las proteínas y la escisión del RNA. Los microRNAs que intervienen en el camino de la escisión del RNA se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) que es similar o idéntico al observado para RNAi.

La presente invención se refiere a un fragmento de ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de desoxirribonucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 16 en la cual (i) los nucleótidos 249 a 269 de SEQ ID NO 16 están reemplazados por una primera subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre 19 y 24 nucleótidos dependiendo de una secuencia diana cuya expresión debe reducirse, (ii) los nucleótidos 316 a 336 de SEQ ID NO 16 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre 19 y 24 nucleótidos, siendo dicha segunda subsecuencia variable de nucleótidos capaz de hibridarse a la primera subsecuencia variable y (iii) el miRNA precursor producido por dicho fragmento de ácido nucleico aislado tiene la misma estructura troncal que el miRNA precursor producido por SEQ ID NO: 16 endógena.

A este fragmento de ácido nucleico aislado que comprende un miRNA precursor puede hacerse referencia también como una "cadena principal de miRNA". Es bien conocido por los expertos en la técnica que es difícil diferenciar si un transcrito es un pri-miRNA de longitud total o un pre-miRNA. Por ello, un miRNA precursor se define funcionalmente como una secuencia de nucleótidos que es capaz de producir un miRNA.

Otros fragmentos nucleicos aislados descritos, incluyen los siguientes:

a) transcrito a partir de un fragmento de ácido nucleico aislado, que comprende un miRNA precursor, correspondiendo dicho miRNA precursor sustancialmente a la secuencia de desoxirribonucleótidos indicada en SEQ ID NO:14 (i) donde los nucleótidos 275 a 295 SEQ ID NO:14 están reemplazados por una primera subsecuencia

variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 a aproximadamente 30 nucleótidos dependiendo de la secuencia diana cuya expresión debe reducirse y (ii) donde además los nucleótidos 121 a 141 de SEQ ID NO:14 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 a aproximadamente 30 nucleótidos, siendo capaz dicha subsecuencia variable de nucleótidos de hibridar a la primera subsecuencia variable del miRNA precursor;

b) un fragmento de ácido nucleico aislado, que comprende un precursor miRNA, correspondiendo dicho precursor miRNA sustancialmente a la secuencia de desoxiribonucleótidos indicada en SEQ ID NO:15 (i) donde los nucleótidos 262 a 282 de la SEQ ID NO:15 están reemplazados por una primera subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 a aproximadamente 30 nucleótidos dependiendo de la secuencia diana cuya expresión debe reducirse y (ii) donde además los nucleótidos 155 a 175 de SEQ ID NO:15 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 a aproximadamente 30 nucleótidos, siendo capaz dicha subsecuencia variable de nucleótidos de hibridar a la primera subsecuencia variable del miRNA precursor;

c) un fragmento de ácido nucleico aislado, que comprende un precursor miRNA, correspondiendo dicho precursor miRNA sustancialmente a la secuencia de desoxiribonucleótidos indicada en SEQ ID NO:16 (i) donde los nucleótidos 249 a 269 de la SEQ ID NO:16 están reemplazados por una primera subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 a aproximadamente 30 nucleótidos dependiendo de la secuencia diana cuya expresión debe reducirse y (ii) donde además los nucleótidos 316 a 336 de SEQ ID NO:16 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 a aproximadamente 30 nucleótidos, siendo capaz dicha subsecuencia variable de nucleótidos de hibridar a la primera subsecuencia variable del miRNA precursor;

d) un fragmento de ácido nucleico aislado, que comprende un precursor miRNA, correspondiendo dicho precursor miRNA sustancialmente a la secuencia de desoxiribonucleótidos indicada en SEQ ID NO:17 (i) donde los nucleótidos 196 a 216 de la SEQ ID NO:17 están reemplazados por una primera subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 a aproximadamente 30 nucleótidos dependiendo de la secuencia diana cuya expresión debe reducirse y (ii) donde además los nucleótidos 262 a 282 de SEQ ID NO:17 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 a aproximadamente 30 nucleótidos, siendo capaz dicha subsecuencia variable de nucleótidos de hibridar a la primera subsecuencia variable del miRNA precursor; y

e) un fragmento de ácido nucleico aislado, que comprende un precursor miRNA, correspondiendo dicho precursor miRNA sustancialmente a la secuencia de desoxiribonucleótidos indicada en SEQ ID NO:18 (i) donde los nucleótidos 127 a 147 de la SEQ ID NO:18 están reemplazados por una primera subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 a aproximadamente 30 nucleótidos dependiendo de la secuencia diana cuya expresión debe reducirse y (ii) donde además los nucleótidos 53 a 73 de SEQ ID NO:18 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre aproximadamente 19 a aproximadamente 30 nucleótidos, siendo capaz dicha subsecuencia variable de nucleótidos de hibridar a la primera subsecuencia variable del miRNA precursor.

Cualquiera de estos fragmentos de ácido nucleico aislados puede utilizarse luego para producir un constructo recombinante que comprende estos fragmentos de ácido nucleico aislados enlazados operativamente a como mínimo una secuencia reguladora. Estos constructos pueden transformarse en células vegetales de tal modo que la célula vegetal transformada comprende el constructo recombinante en su genoma. Preferiblemente, la célula vegetal puede ser una célula de planta dicotiledónea. Ejemplos de células de plantas dicotiledóneas incluyen, pero sin carácter limitante, soja, colza, girasol, lino, algodón, alfalfa, cebada, judía, guisante, tabaco, y *Arabidopsis*.

La célula vegetal de dicotiledónea más preferida es soja.

En otro aspecto, esta invención concierne a un método para reducir la expresión de una secuencia diana en una célula vegetal, comprendiendo dicho método:

(a) transformar al menos una célula vegetal con un constructo de ácido nucleico que comprende el fragmento de ácido nucleico aislado descrito en la reivindicación 1, y

(b) seleccionar aquella o aquellas células de plantas transformadas cuyo nivel de expresión de la secuencia diana es reducido cuando se compara con el nivel de expresión de la secuencia diana en una célula de la planta de tipo salvaje.

Se han utilizado con éxito métodos bioinformáticos para predecir dianas para miRNAs de plantas (Llave et al., *Plant Cell* 14:1605-1619, 2002; Park et al., *Curr. Biol.* 12:1484-1495, 2002; Rhoades et al., *Cell* 110:513-520, 2002), y así parece ser que los miRNAs de plantas tienen mayor complementariedad global con sus dianas supuestas que los miRNAs animales. La mayor parte de estos transcritos diana predichos de miRNAs de plantas codifican miembros de familias de factores de transcripción implicados en la modelización del desarrollo de las plantas o la diferenciación celular.

Categorías generales de secuencias de interés incluyen, por ejemplo, aquellos genes implicados en la regulación o información, tales como dedos de cinc, factores de transcripción, genes homeóticos, o moduladores del ciclo celular y la muerte celular, los implicados en comunicación, tales como quinasas, y los implicados en mantenimiento, tales como proteínas del choque térmico.

- 5 Las secuencias diana pueden incluir regiones codificantes y regiones no codificantes tales como promotores, intensificadores, terminadores, intrones y análogos.

La secuencia diana puede ser una secuencia endógena, o puede ser una secuencia heteróloga introducida, o transgén. Por ejemplo, los métodos pueden utilizarse para alterar la regulación o expresión de un transgén, o para eliminar un transgén u otra secuencia introducida tal como un sitio de recombinación de acción específica introducido. La secuencia diana puede ser también una secuencia de un patógeno, por ejemplo, la secuencia diana puede proceder de un patógeno de plantas tal como un virus, un moho u hongo, un insecto, o un nematodo. Un miRNA podría expresarse en una planta que, después de infección o infestación, se direccionara hacia el patógeno y confiriere a la planta cierto grado de resistencia.

En las plantas, otras categorías de secuencias diana incluyen genes que afectan a rasgos agronómicos, resistencia a los insectos, resistencia a enfermedades, resistencia a herbicidas, esterilidad, características de la semilla, y productos comerciales. Genes de interés incluyen también los implicados en el metabolismo del aceite, el almidón, los carbohidratos, o los nutrientes así como aquéllos que afectan por ejemplo, al tamaño de la almendra, la carga de sacarosa, y análogos. La calidad de la semilla se refleja en rasgos tales como niveles y tipos de aceites, saturados e insaturados, calidad y cantidad de aminoácidos esenciales, y niveles de celulosa. Por ejemplo, podrían suprimirse genes del camino biosintético del ácido fítico para generar un fenotipo fosforoso de alta disponibilidad. Véanse, por ejemplo, las enzimas biosintéticas del ácido fítico que incluyen inositol-polifosfato-quinasa-2-polinucleótidos, descritos en WO 02/059324, inositol-1,3,4-trisfosfato-5/6-quinasa-polinucleótidos, descritos en WO 03/027243 y mioinositol-1-fosfato-sintasa y otros polinucleótidos biosintéticos de fitato, descritos en WO 99/05298. Los genes del camino de la lignificación podrían suprimirse a fin de mejorar la facilidad de digestión o la disponibilidad de energía. Los genes que afectan al ciclo celular o la muerte celular podrían suprimirse para afectar al crecimiento o la respuesta al estrés. Los genes que afectan a la reparación y/o recombinación del DNA podrían suprimirse a fin de aumentar la variabilidad genética. Los genes que afectan al tiempo de floración podrían suprimirse, así como los genes que afectan a la fertilidad. Podría suprimirse cualquier secuencia diana a fin de evaluar o confirmar su papel en un rasgo o fenotipo particular, o para analizar minuciosamente un camino o red molecular, regulador, bioquímico o proteómico.

Pueden utilizarse diversos promotores. Estos promotores pueden seleccionarse basándose en el resultado deseado. Está reconocido que diferentes aplicaciones se verán mejoradas por el uso de promotores diferentes en casetes de expresión de plantas para modular la temporización, la localización y/o el nivel de expresión del miRNA. Tales casetes de expresión de plantas pueden contener también, en caso deseado, una región reguladora del promotor (v.g., una que confiera expresión inducible, constitutiva, regulada ambientalmente o a lo largo del desarrollo, o expresión específica/selectiva de células o tejidos), un sitio de partida del comienzo de la transcripción, un sitio de fijación de ribosoma, una señal de procesamiento del RNA, un sitio de terminación de la transcripción, y/o una señal de poliadetilación.

Pueden emplearse promotores constitutivos, preferidos de tejidos o inducibles. Ejemplos de promotores constitutivos incluyen la región de iniciación de la transcripción del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S, el promotor 1' o 2' derivado de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*, el promotor 1 de ubiquitina, el promotor Smas, el promotor de cinamil-alcohol-deshidrogenasa (Patente U.S. Núm. 5.683.439), el promotor Nos, el promotor pEmu, el promotor rubisco, el promotor GRP1-8 y otras regiones de iniciación de la transcripción de diversos genes de plantas conocidas por los expertos. Si se desea expresión de nivel bajo, pueden utilizarse uno o más promotores débiles. Promotores constitutivos débiles incluyen, por ejemplo, el promotor de núcleo del promotor Rsyn7 (WO 99/43838 y Patente U.S. Núm. 6,072.050), el promotor de núcleo de CaMV 35S, y análogos. Otros promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, las Patentes U.S. Núms. 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; y 5.608.142. Véase también la Patente U.S. Núm. 6.177.611.

Ejemplos de promotores inducibles son el promotor Adh1 que es inducible por hipoxia o estrés por frío, el promotor Hsp70 que es inducible por estrés térmico, el promotor PPDK y el promotor pepcarboxilasa, los dos cuales son inducibles por la luz. Son útiles también promotores que son químicamente inducibles, tales como el promotor In2-2 que es inducido por agentes fitoprotectores (Patente U.S. Núm. 5.364.780), el promotor ERE que es inducido por estrógenos, y el promotor Axig1 que es inducido por auxina y específico del tapete, pero activo también en callo (PCT US 01/22169).

Ejemplos de promotores bajo control del desarrollo incluyen promotores que inician la transcripción preferentemente en ciertos tejidos, tales como hojas, raíces, frutos, semillas, o flores. Un promotor ilustrativo es el promotor 5126 específico de las anteras (Patentes U.S. Núms. 5.689.049 y 5.689.051). Ejemplos de promotores específicos de semillas incluyen, pero sin carácter limitante, el promotor gamma-zeína de 27 kD y el promotor céreo, Boronat, A. et al. (1986) *Plant Sci.* 47:95-102; Reina, M. et al. *Nucl. Acids Res.* 18(21):6426; y Kloesgen, R.B. et al. (1986) *Mol.*

Gen. Genet. 203:237-244. Promotores que se expresan en el embrión, el pericarpio, y el endospermo se describen en la Patente U.S. 6.225.529 y la publicación PCT WO 00/12733.

En algunas realizaciones, será beneficioso expresar el gen de un promotor inducible, particularmente de un promotor inducible por patógenos. Tales promotores incluyen los de las proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR), que son inducidos subsiguientemente a la infección por un patógeno; *v.g.*, proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanasa, quitinasa, etc. Véase, por ejemplo, Redolfi et al. (1983) *Neth. J. Plant Pathol.* 89:245-254; Uknes et al. (1992) *Plant Cell* 4:645-656; y Van Loon (1985) *Plant Mol. Virol.* 4:111-116. Véase también WO 99/43819.

Presentan interés los promotores que se expresan localmente en o cerca del sitio de infección por un patógeno. Véase, por ejemplo, Marineau et al. (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:335-342; Matton et al. (1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-331; Somsisch et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2427-2430; Somsisch et al. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 2:93-98; y Yang (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14972-14977. Véanse también, Chen et al. (1996) *Plant J.* 10:955-966; Zhang et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2507-2511; Wamer et al. (1993) *Plant J.* 3:191-201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961-968; Patente U.S. Núm. 5.750.386 (inducible por nematodos). De interés particular es el promotor inducible para el gen PRms del maíz, cuya expresión es inducida por el patógeno *Fusarium moniliforme* (véase, por ejemplo, Cordero et al. (1992) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41: 189-200).

Adicionalmente, dado que los patógenos encuentran entrada en las plantas a través de heridas o deterioro por los insectos, puede utilizarse un promotor inducible por heridas en las construcciones de los polinucleótidos. Tales promotores inducibles por heridas incluyen el gen inhibidor (pin II) de la proteinasa de patata (Ryan (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28:425-449; Duan et al. (1996) *Nature Biotech.* 14:494-498); *wun1* y *wun2*, Patente U.S. Núm. 5.428.148; *win1* and *win2* (Stanford et al. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215:200-208); *sistemina* (McGurl et al. (1992) *Science* 225:1570-1573); *WIP1* (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Lett.* 323:73-76); gen *MPI* (Corderok et al. (1994) *Plant J.* 6(2):141-150); y similares.

Pueden utilizarse promotores regulados químicamente para modular la expresión de un gen en una planta por la aplicación de un regulador químico exógeno. Dependiendo del objetivo, el promotor puede ser un promotor inducible químicamente, donde la aplicación del producto químico induce la expresión génica, o un promotor reprimible químicamente, en cuyo caso la aplicación del producto químico reprime la expresión del gen. Promotores inducibles químicamente se conocen en la técnica e incluyen, pero sin carácter limitante, el promotor *In2-2* del maíz, que es activado por fitoprotectores herbicidas de benzenosulfonamida, el promotor *GST* del maíz, que es activado por compuestos hidrófobos electrófilos que se utilizan como herbicidas antes del brote, y el promotor *PR-1a* del tabaco, que es activado por ácido salicílico. Otros promotores de interés regulados químicamente incluyen promotores sensibles a los esteroides (véase, por ejemplo, el promotor inducible por glucocorticoides en Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421-10425 y McNellis et al. (1998) *Plant J.* 14(2):247-257) y los promotores inducibles por tetraciclinas y reprimibles por tetraciclinas (véase, por ejemplo, Gatz et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227: 229-237, y las Patentes U.S. Núms. 5.814.618 y 5.789.156).

Pueden utilizarse promotores preferidos de tejidos para direccionar la expresión mejorada de una secuencia de interés dentro de un tejido vegetal particular. Promotores preferidos de tejidos incluyen Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamata et al. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansen et al. (1997) *Mol. Gen Genet.* 254(3):337-343; Russell et al. (1997) *Transgenic Res.* 6(2):157-168; Rinehart et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(3):1331-1341; Van Camp et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevascini et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:181-196; Orozco et al. (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6):1129-1138; Matsuoka et al. (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590; y Guevara-García et al. (1993) *Plant J.* 4(3) 495-505. Tales promotores pueden modificarse, en caso necesario para expresión débil.

Se conocen en la técnica promotores preferidos de hojas. Véase, por ejemplo, Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kwon et al. (1994) *Plant Physiol.* 105:357-67; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Gotor et al. (1993) *Plant J.* 3:509-18; Orozco et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 23(6):1129-1138; y Matsuoka et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590. Adicionalmente, pueden utilizarse también los promotores de *cab* y *rubisco*. Véase, por ejemplo, Simpson et al. (1958) *EMBO J* 4: 2723-2729 y Timko et al. (1988) *Nature* 318: 57-58.

Se conocen promotores preferidos de raíces y pueden seleccionarse de los muchos disponibles de la bibliografía o aislarse de novo de diversas especies compatibles. Véase, por ejemplo, Hire et al. (1992) *Plant Mol Biol.* 20(2):207-218 (gen de glutamina-sintetasa específico de raíz de la soja); Keller y Baumgartner (1991) *Plant Cell* 3(10):1051-1061 (elemento de control específico de raíz en el gen 1.8 de la judía verde); Sanger et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 14(3):433-443 (promotor específico de raíz del gen de manopina-sintasa (MAS) de *Agrobacterium tumefaciens*); y Miao et al. (1991) *Plant Cell* 3(1):11-22 (clon de cDNA de longitud total que codifica la glutamina-sintetasa (GS) citosólica, que se expresa en las raíces y los nódulos de las raíces de la soja). Véase también Bogusz et al. (1990) *Plant Cell* 2(7): 633-641, donde se describen dos promotores específicos de raíces aislados de genes de hemoglobina de la no-legumbre *Parasponia andersonii* fijadora de nitrógeno y la no-legumbre afín *Trema tomentosa* no fijadora de nitrógeno. Los promotores de estos genes se ligaron a un gen informador de β -glucuronidasa y se introdujeron tanto en la no-legumbre *Nicotiana tabacum* y la legumbre *Lotus corniculatus*, y en ambos casos se preservaba la actividad

promotora específica de raíz. Lech y Aoyagi (1991) describen su análisis de los promotores de los genes inductores de raíces rolC y rolD fuertemente expresados de *Agrobacterium rhizogenes* (véase *Plant Science* (Limerick) 79(1): 69-76). Dichos autores llegaron a la conclusión de que los determinantes de DNA intensificadores y preferidos de tejidos están disociados en dichos promotores. Teeri et al. (1989) utilizaron la fusión de genes a lacZ para demostrar que el gen de T-DNA de *Agrobacterium* que codifica la octopina-sintasa es especialmente activo en la epidermis del ápice de la raíz y que el gen TR2' es específico de raíz en la planta intacta y es estimulado por heridas en el tejido de las hojas, una combinación especialmente deseable de características para uso con un gen insecticida o larvicida (véase *EMBO J.* 8(2): 343-350). El gen TR1', fusionado a nptII (neomicin-fosfotransferasa II) exhibía características similares. Promotores adicionales preferidos de raíces incluyen el promotor del gen VfENOD-GRP3 (Kuster et al. (1995) *Plant Mol. Biol.* 29(4):759-772); y el promotor rolB (Capana et al. (1994) *Plant Mol. Biol.* 25(4):681-691. Véanse también las Patentes U.S. Núms. 5.837.876; 5.750.386; 5.633.363; 5.459.252; 5.401.836; 5.110.732; y 5.023.179. El gen de faseolina (Murai et al. (1983) *Science* 23:476-482 y Sengopta-Gopalen et al. (1988) *PNAS* 82:3320-3324.

Los protocolos de transformación, así como protocolos para introducción de secuencias de nucleótidos en las plantas pueden variar dependiendo del tipo de planta o célula de planta, es decir, monocotiledónea o dicotiledónea, direccionada para transformación. Métodos adecuados de introducción del constructo de DNA incluyen microinyección (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4:320-334; y la Patente U.S. Núm. 6.300.543), cruce sexual, electroporación (Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606), transformación mediada por *Agrobacterium* (Townsend et al., Patente U.S. Núm. 5.563.055; y la Patente U.S. Núm. 5.981.840), transferencia directa de genes (Paszkowski et al. (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722), y aceleración balística de partículas (véanse, por ejemplo, Sanford et al., Patente U.S. Núm. 4.945.050; Tomes et al., Patente U.S. Núm. 5.879.918; Tomes et al., Patente U.S. Núm. 5.886.244; Bidney et al., Patente U.S. Núm. 5.932.782; Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," en *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlín); y McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6:923-926). Véanse también Weisinger et al. (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford et al. (1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (cebolla); Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (soja); Finer y McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182 (soja); Singh et al. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324 (soja); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (arroz); Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309 (maíz); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (maíz); Tomes, Patente U.S. Núm. 5.240.855; Busing et al., Patentes U.S. Núms. 5.322.783 y 5.324.646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444 (maíz); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (maíz); Hooykaas-Van Slooter et al. (1984) *Nature* (Londres) 311:763-764; Bowen et al., Patente U.S. Núm. 5.736.369 (cereales); Bytebier et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (Liliáceas); De Wet et al. (1985) en *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, Nueva York), pp. 197-209 (polen); Kaeppler et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418 y Kaeppler et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (transformación mediada por triquitas); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (electroporación); Li et al. (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255 y Christou y Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (arroz); Osjoda et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (maíz, vía *Agrobacterium tumefaciens*); y la Patente U.S. Núm. 5.736.369 (transformación de meristemas).

Los constructos de nucleótidos pueden introducirse en las plantas poniendo en contacto las plantas con un virus o ácidos nucleicos virales. Generalmente, tales métodos implican incorporación de un constructo de nucleótidos de la invención dentro de una molécula de DNA o RNA viral. Adicionalmente, está reconocido que los promotores útiles abarcan promotores utilizados para transcripción por RNA-polimerasas virales. Métodos para introducción de constructos de nucleótidos en plantas y expresión de una proteína codificada en ellas, que implican moléculas de DNA o RNA virales, se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. Núms. 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367 y 5.316.931.

En algunas realizaciones, puede desearse expresión transitoria. En tales casos, pueden utilizarse técnicas estándar de transformación transitoria. Tales métodos incluyen, pero sin carácter limitante, métodos de transformación viral, y microinyección de DNA o RNA, así como otros métodos bien conocidos en la técnica.

Las células de las plantas que han incorporado de manera estable la secuencia de nucleótidos pueden dejarse crecer en plantas de acuerdo con vías convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5: 81-84. Estas plantas pueden cultivarse luego, y polinizarse con la misma cepa transformada o cepas diferentes, y el híbrido resultante que tiene expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada impartida por la secuencia de nucleótidos de interés y/o los marcadores genéticos contenidos en el sitio diana o casete de transferencia. Pueden cultivarse dos o más generaciones para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene de manera estable y se hereda, y cosecharse posteriormente las semillas para asegurarse de que se ha conseguido la expresión de la característica fenotípica deseada.

Las lipoxigenasas son dioxigenasas que catalizan, como reacción primaria, la hidroperoxidación, por el oxígeno molecular, del ácido linoleico (18: 2) y cualesquiera otros lípidos poliinsaturados que contengan un resto cis,cis-1,4-pentadieno. Las lipoxigenasas (a las que se hace referencia también como LOX) son enzimas ubicuas asociadas a la membrana que catalizan el primer paso de un camino del metabolismo de los ácidos grasos. Los productos de este camino se encuentran como moléculas señal, implicadas en la regulación del crecimiento y el desarrollo, en la senescencia, y en la respuesta a la invasión por patógenos y el estrés por heridas (Rosahl (1996) *Z. Naturforsch.* (C)

51: 123-138). Lipoxigenasas con especificidades diferentes, localización subcelular, y patrones de expresión específicos de tejido han sido identificadas en varias plantas que incluyen arroz, cebada, soja, tomate, pepino y patata.

Las semillas de soja contienen niveles altos de lipoxigenasa. Tres isozimas expresadas en semillas, designadas lipoxigenasas 1, 2 y 3 (a las que se hace referencia también como LOX1, LOX2, y LOX3), han sido identificadas y bien caracterizadas enzimáticamente. Los genes que codifican las tres isozimas de las semillas de soja han sido clonados y secuenciados. Sin embargo, no se ha atribuido todavía ningún papel fisiológico claro a las lipoxigenasas de la semilla de soja (Siedow (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 145-188).

Ejemplos

Ejemplo 1

10 Aislamiento de Genes Precusores de MicroRNA Genómico

Se utilizaron secuencias codificantes de porciones de precursores de microRNA de soja encontradas en miRBase (miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. *NAR*, 2006, 34, Database Issue, D140-0144; The microRNA Registry. Griffiths-Jones S. *NAR*, 2004, 32, Database Issue, D109-D111; Dezulian T, Palatnik JF, Huson DH, Weigel D (2005) Conservation and divergence of microRNA families in plants) como consultas para análisis BLAST de la colección Pioneer Unisoy 3.0 de etiquetas de secuencia expresadas. Los iniciadores siguientes (adquiridos de MWG-BIOTECH Inc.) se diseñaron para amplificar una selección de seis de estas secuencias (véase Tabla 1).

Tabla 1: Iniciadores para Amplificación de Precusores de MicroRNA Genómico

Iniciador	Secuencia del Iniciador	SEQ ID NO	Dirección
156cA	5'-ggtacctcgagttcatcaaagaaaataacttctgaac-3'	1	sentido
156cS	5'-ggtacatgtagaatntacacttggtagcctg-3'	2	antisentido
159A	5'-ggtacctcgagtctagctagctagggttggtag-3'	3	sentido
159S	5'-ggtacatgtagaatntacacttggtagcctg-3'	4	antisentido
166bA	5'-ggtacctcgaggtgcagattgagagaagatgaaag-3'	5	antisentido
166bS	5'-ggtacatgtagaatntacacttggtagcctg-3'	6	sentido
168cA	5'-ggtacctcgaggtgctcttataataaccctcg-3'	7	sentido
168cS	5'-ggtacatgtagaatntacacttggtagcctg-3'	8	antisentido
396bA	5'-ggtacctcgagcttatataacaaagccataaaatc-3'	9	antisentido
396bS	5'-ggtacatgtagaatntacacttggtagcctg-3'	10	sentido
398bA	5'-ggtacctcgagtattccacaatgatgtattcttac-3'	11	antisentido
398bS	5'-ggtacatgtagaatntacacttggtagcctg-3'	12	sentido

20 Todos los iniciadores con un sufijo "A" (SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 11) incluían nucleótidos que codificaban un sitio Kpn I (GGTACC) y un sitio Xho I (CTCGAG). Todos los iniciadores con sufijo "S" (SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 12) incluían nucleótidos que codificaban un sitio Bam HI (GGATCC) y un sitio Nco I (CCATGG).

25 Se cultivaron semillas de *Glycine max cv. Jack* en una cámara de cultivo y se obtuvo DNA genómico a partir de tejido de hojas utilizando el kit Qiagen DNeasy Plant Maxi de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de DNA se amplificaron utilizando el DNA genómico como molde y los pares de iniciadores anteriores con polimerasa ExTaq (TaKaRa Bio Inc.). Los productos de DNA resultantes se clonaron en pCR2.1 (Invitrogen) y se secuenciaron completamente. Los precursores de microRNA caracterizados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencias Precursoras de MicroRNA

Precursor de microRNA	SEQ ID NO	Longitud (nucs)
156c	13	847
159	14	958
166b	15	394
168c	16	1068
396b	17	574
398b	18	463

Ejemplo 2

Diseño de Secuencias Artificiales de MicroRNA

5 MicroRNAs artificiales (amiRNAs) que podrían tener la capacidad para silenciar los genes diana deseados se diseñaron en líneas generales de acuerdo con las reglas descritas en Schwab R, et al. (2005) *Dev Cell* 8: 517-27. Para resumir, las secuencias de microRNA tienen una longitud de 21 nucleótidos, comienzan en su extremo 5' con una "U", y exhiben inestabilidad en 5' con relación a su secuencia estrella que se alcanza por inclusión de una C o G en la posición 19, y su décimo nucleótido es un "A" o un "U". un requerimiento adicional para el diseño de microRNA artificiales era que los amiRNAs tienen un delta-G libre alto como se calcula utilizando el algoritmo ZipFold (Mar-
 10 kham, N.R. & Zuker, M. (2005) *Nucleic Acids Res.* 33: W577-W581. Opcionalmente, se añadió un cambio en un solo par de bases dentro de la porción 5' del amiRNA de tal modo que la secuencia difería de la secuencia diana en un solo nucleótido. El amiRNA que se utilizó para silenciar la lipoxigenasa era 5'-ucaucagucauccauggagac-3' (SEQ ID NO: 19). El amiRNA que se utilizó para silenciar fad2-1 era 5'-ugagggaaaagguugaggaa-3' (la secuencia de DNA correspondiente a este amiRNA se representa por SEQ ID NO: 20). El amiRNA que se utilizó para silenciar el fad2-2 era 5'-uccacauaaaucacucucu-3' (la secuencia de DNA correspondiente a este amiRNA se representa por SEQ ID
 15 NO: 21).

Ejemplo 3

Diseño de una Secuencia Estrella Artificial

20 Las "secuencias estrella" son aquellas cuyas bases están apareadas con las secuencias de amiRNA, en el RNA precursor, para formar estructuras troncales imperfectas. Para formar una estructura troncal perfecta, la secuencia estrella tendría que ser el completo inverso exacto del amiRNA. La secuencia precursora de maíz que ha sido descrita por Zhang et al. en la Tabla S1 de material Suplementario se plegó utilizando mFold (M. Zuker (2003) *Nucleic Acids Res.* 31: 3406-15; y D.H. Mathews, J. et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 288: 911-940). La secuencia de miRNA se reemplazó luego con la secuencia de amiRNA y la secuencia estrella endógena se reemplazó con el complemento
 25 inverso exacto del amiRNA. Se introdujeron cambios en la secuencia estrella artificial de tal modo que la estructura troncal se mantuviera idéntica a la estructura endógena. La secuencia alterada se plegó luego con mFold y las estructuras original y alterada se compararon a simple vista. En caso necesario, se introdujeron alternancias adicionales a la secuencia estrella artificial para mantener la estructura original. Las secuencias de DNA correspondientes a las secuencias estrella artificiales que se utilizaron para silenciar los genes diana deseados se muestran en la Tabla
 30 3.

Tabla 3: Secuencias Estrella Artificiales de MicroRNA

Precursor de amiRNA	Secuencia Estrella	SEQ ID NO
156c-lox	5'-caatccctgttcgactgtaca-3'	22
159-lox	5'-gtctccatggagaactgatgt-3'	23
166b-lox	5'-cactccattatgactctga-3'	24
168c-lox	5'-ctctccctggatgactgtga-3'	25
398b-lox	5'-gtcgccagtgatgactgatga-3'	26
159-fad2-1b	5'-ttcctcaaccacaattccctct-3'	27
166b-fad2-1b	5'-cccctcaaggctttcaatca-3'	28

396b-fad2-1 b	5'-ttactcaaccctttccctca-3'	29
159-fad2-2	5'-aagagagtgtacctatgtggt-3'	30

Ejemplo 4

Conversión de Precusores de MicroRNA Genómico en Precusores de MicroRNA Artificiales

5 Los genes precursores de miRNA genómico pueden convertirse en amiRNAs utilizando PCR solapante y los DNAs resultantes se secuencian completamente. Estos DNAs se clonan luego aguas abajo de un promotor apropiado en un vector capaz de transformación de soja.

Como alternativa, los amiRNAs pueden ser sintetizados comercialmente, por ejemplo por Codon Devices (Cambridge, MA). El DNA sintetizado se clona luego aguas abajo de un promotor apropiado en un vector capaz de transformación de soja.

Ejemplo 5

10 Conversión de Precusores de MicroRNA Genómico en Precusores de MicroRNA Artificiales

Los genes precursores de miRNA genómico se convirtieron en precursores de amiRNA utilizando PCR de solapamiento como se describe en el Ejemplo 4 y los DNA resultantes se secuenciaron completamente. Se obtuvieron los nueve precursores de amiRNAs siguientes:

Tabla 4: Secuencias Precursoras de MicroRNA Artificiales

Precursor de microRNA	SEQ ID NO	Longitud (nucs)	Constructo de Expresión
156c-lox	31	844	PHP34018
159-lox	32	958	PHP32803
166b-lox	33	358	PHP34019
168c-lox	34	1072	PHP31104
398b-lox	35	463	PHP34044
159-fad2-1b	36	958	PHP32511
166b-fad2-1b	37	358	PHP32421
396b-fad2-1b	38	604	PHP32510
159-fad2-2	39	958	see below

15 Las SEQ IDs Nos: 31-38 se clonaron luego individualmente aguas abajo del promotor de beta-conglicina en el plásmido PHP27253 (conocido también como plásmido KS332, descrito en la Solicitud de Patente US Núm. 60/939872, designación de los solicitantes BB-1623 US PRV) para formar los constructos de expresión PHP34018, PHP32803, PHP34019, PHP31104, PHP34044, PHP32511, PHP32421, y PHP32510, respectivamente. Se clonó un
 20 segundo precursor de amiRNA, 159-fad2-2 (SEQ ID NO: 39) en 3' (aguas abajo) de 396b-fad2-1b (SEQ ID NO: 38; que se clonó en PHP27253 para formar PHP32510) en PHP32510 para formar el constructo PHP32843. De manera similar, se clonó 159-fad2-2 en 3' (aguas abajo) de 159-fad2-1b (SEQ ID NO: 36; PHP32511) para formar el constructo PHP32869.

Ejemplo 6

25 Transformación de Soja

Condiciones de cultivo:

30 Se mantienen cultivos de embriones de soja (cv. Jack) en suspensión en 35 ml de medio líquido SEB196 (*infra*) en un agitador de sacudidas rotativo, a 150 rpm y 26°C con luces fluorescentes blancas frías con arreglo a un fotoperiodo de 16:8 horas día/noche con intensidad luminosa de 60-85 µE/m²/s. los cultivos se cubcultivan cada siete días a dos semanas por inoculación de aproximadamente 35 mg de tejido en 35 ml de líquido SB196 nuevo (el intervalo de subcultivo preferido es cada 7 días).

Los cultivos de embriones de soja en suspensión se transforman con plásmidos de expresión de soja por el método del bombardeo de partículas con cañón electrónico (Klein et al., *Nature*, 327: 70 (1987)) utilizando un instrumento PDS1000/HE de DuPont Biolistic (modificación con helio) para todas las transformaciones.

Iniciación del Cultivo de Embriones de Soja en Suspensión:

5 Los cultivos de soja se inician dos veces cada mes con 5-7 días entre cada iniciación. Se seleccionan vainas con semillas inmaduras de plantas de soja disponibles 45-55 días después de la plantación, se retiran de sus envolturas y se ponen en una caja magenta esterilizada. Las semillas de soja se esterilizan sacudiéndolas durante 15 min en una solución de Clorox al 5% con 1 gota de jabón de marfil (a saber, 95 ml de agua destilada tratada en autoclave más 5 ml de Clorox y una gota de jabón, bien mezclados). Las semillas se lavan utilizando dos botellas de 1 litro de agua destilada estéril y aquéllas que son menores de 4 mm se ponen en portaobjetos de microscopio individuales. El extremo pequeño de la semilla se corta y los cotiledones se expulsan por prensado de la cubierta de la semilla. Los cotiledones se transfieren a placas que contienen medio SB1 (25-30 cotiledones por placa). Las placas se envuelven con cinta de fibra y se guardan durante 8 semanas. Pasado este tiempo, se cortan los embriones secundarios y se ponen en medio líquido SB196 durante 7 días.

15 Preparación del DNA para el Bombardeo:

Se utilizan para el bombardeo un plásmido intacto o un fragmento de plásmido de DNA que contiene los genes de delta-5-desaturasa de interés y el gen marcador seleccionable. Se obtienen fragmentos de plásmidos de expresión de soja que comprenden la delta-5-desaturasa de la presente invención por aislamiento en gel de plásmidos digeridos. Los fragmentos de DNA resultantes se separan por electroforesis en gel sobre GTG agarosa SeaPlaque al 1% (BioWhitaker Molecular Applications) y los fragmentos de DNA que contienen las casetas de gen se cortan del gel de agarosa. El DNA se purifica de la agarosa utilizando la enzima de digestión GELasa conforme al protocolo del fabricante.

25 Se añade una parte alícuota de 50 µl de agua destilada estéril que contiene 3 mg de partículas de oro a 5 µl de una solución de DNA de concentración 1 µg/µl (plásmido intacto o fragmento de DNA preparado como se ha descrito arriba), 50 µl de CaCl₂ 2,5 M y 20 µl de espermidina 0,1 M. La mixtura se sacude durante 3 minutos al nivel 3 de un agitador de sacudidas vorticial y se centrifuga durante 10 segundos en una microcentrífuga de banco. Después de un lavado con 400 µl de etanol 100%, el sedimento se suspende por sonicación en 40 µl de etanol 100%. La suspensión de DNA (5 µl) se distribuye a cada disco volante del disco del instrumento Biolistic PDS1000/HE. Cada parte alícuota de 5 µl contiene aproximadamente 0,375 mg de partículas de oro por bombardeo (es decir, por disco).

30 Preparación del Tejido y Bombardeo con DNA:

Se ponen aproximadamente 150-200 mg de cultivos de suspensión de embriones de 7 días en una cápsula petri vacía y estéril de 60 x 15 mm y se cubre la cápsula con malla de plástico. El tejido se bombardea a razón de una o dos descargas por placa con una presión de rotura de la membrana ajustada a 1100 PSI (77,3 kg/cm², y se hace el vacío en la cámara hasta 27-28 pulgadas de mercurio (68,6-71,1 cm Hg). El tejido se sitúa aproximadamente a 3,5 pulgadas (8,9 cm) del tamiz de retención/parada.

Selección de los Embriones Transformados:

40 Los embriones transformados se seleccionan utilizando higromicina como el marcador seleccionable. Específicamente, después del bombardeo, el tejido se pone en medio SB196 nuevo y se cultiva como se ha descrito arriba. Seis días después del bombardeo, el SB196 se cambia con SB196 nuevo que contiene 30 mg/l de higromicina. El medio de selección se cambia por medio nuevo cada semana. Cuatro a seis semanas después de la selección, se observa el crecimiento de tejido fresco transformado a partir de los aglomerados de embriones necróticos no transformados. El tejido nuevo aislado se retira y se inocula en placas multipocillo para generar nuevos cultivos en suspensión de embriones transformados propagados clonalmente.

Maduración de los Embriones:

45 Los embriones se cultivan durante 4-6 semanas a 26°C en SB196 bajo lámparas fluorescentes blancas frías (Phillips blanca fría Econowatt F40/CW/RS/EW) y Agro (Phillips F40 Agro) (40 vatios) con arreglo a un fotoperiodo de 16: 8 horas con intensidad luminosa de 90-120 µE/m²s. Después de este tiempo, las aglomerados de embriones se pasan a un medio de agar sólido, SB166, durante 1-2 semanas. Las aglomerados se subcultivan luego a medio SB103 durante 3 semanas. Durante este periodo, los embriones individuales se separan de los aglomerados y se escrutan respecto a alteraciones en sus composiciones de ácidos grasos como se ha descrito arriba.

ES 2 421 031 T3

Formulaciones de medio:

SB196 - Medio de Purificación Líquido FN Ligero (por litro)

MS FeEDTA - 100x Stock 1	10 ml
MS Sulfato - 100x Stock 2	10 ml
FN Ligero Haluros - 100x Stock 3	10 ml
FN Ligero P, B, Mo - 100x Stock 4	10 ml
Vitaminas B5 (1 ml/l)	1,0 ml
2,4-D (concentración final 10 mg/l)	1,0 ml
KNO ₃	2,83 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,463 g
Asparagina	1,0 g
Sacarosa (1%)	10 g
pH 5,8	

Soluciones Stock de FN Ligero

	Número de Stock	1000 ml	500 ml
1	<i>MS FeEDTA - 100x Stock</i>		
	Na ₂ EDTA*	3,724 g	1,862 g
	FeSO ₄ - 7H ₂ O	2,784 g	1,392 g
	* Añadir primeramente, y disolver en botella oscura mientras se agita		
2	<i>MS Sulfato 100x Stock</i>		
	MgSO ₄ - 7H ₂ O	37,0 g	18,5 g
	MN SO ₄ - H ₂ O	1,69 g	0,845 g
	ZnSO ₄ - 7H ₂ O	0,86 g	0,43 g
	CuSO ₄ - 5H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g
3	<i>Fn Ligero Haluros 100x Stock</i>		
	CaCl ₂ - 2H ₂ O	30,00 g	15,00 g
	KI	0,083 g	0,0715 g
	CoCl ₂ - 6H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g
4	<i>FN Ligero P, B, Mo 100x Stock</i>		
	KH ₂ PO ₄	18,5 g	9,25 g
	H ₃ BO ₃	0,62 g	0,31 g
	Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0,025 g	0,0125 g

ES 2 421 031 T3

Medio Sólido SB1 (por litro)

1 paquete sales MS (Gibco/BRL-Cat. Núm. 11117-066)

1 ml vitaminas B5 100x Stock

31,5 g sacarosa

5 2 ml 2,4-D (concentración final 20 mg/l)

pH 5,7

8 g agar TC

Medio Sólido SB166 (por litro)

1 paquete sales MS (Gibco/BRL-Cat. Núm. 11117-066)

10 1 ml vitaminas B5 100x Stock

60 g maltosa

750 mg MgCl₂ hexahidratado

5 g carbón vegetal activado

pH 5,7

15 2 g Gelrite

Medio Sólido SB103 (por litro)

1 paquete sales MS (Gibco/BRL-Cat. Núm. 11117-066)

1 ml vitaminas B5 100x Stock

60 g maltosa

20 750 mg MgCl₂ hexahidratado

pH 5,7

2 g Gelrite

Medio Sólido SB71-4 (por litro)

1 botella sales Gamborg B5 con sacarosa (Gibco/BRL-Cat. Núm. 21153-036)

25 pH 5,7

5 g agar TC

Stock de 2,4-D

Se obtiene prefabricado por Phytotech Cat. Núm. D295 - concentración 1 mg/ml

Stock de Vitaminas B5 (por 100 ml)

30 Se guardan partes alícuotas a -20°C

10 g mio-inositol

100 mg ácido nicotínico

100 mg piridoxina.HCl

1 g tiamina

35 Si la solución no se disuelve de modo suficientemente rápido, se aplica un nivel bajo de calor por medio de la placa de agitación caliente.

Análisis Funcional en Embriones Somáticos de Soja

Los embriones somáticos de soja maduros son un buen modelo para embriones cigóticos. Mientras se encuentran en estado globular del embrión en cultivo líquido, los embriones somáticos de soja contienen cantidades muy bajas de triacil-glicerol (TAG) o proteínas de almacenamiento típicas de los embriones de soja cigóticos en maduración. En esta etapa del desarrollo, la ratio de triacilglicérido total a lípido polar total (fosfolípidos y glicolípidos) es aproximadamente 1:4, como es típico de los embriones cigóticos de soja en la etapa de desarrollo a partir de la cual se inició el cultivo de los embriones somáticos. Asimismo, en la etapa globular están esencialmente ausentes los mRNAs para las proteínas de soja prominentes, subunidad α' de β -conglucina, inhibidor 3 de tripsina Kunitz, y lectina de semilla. Después de la transferencia al medio exento de hormonas para permitir diferenciación al estado de embrión somático en maduración, TAG se convierte en la clase de lípido más abundante. Asimismo, los mRNAs para la subunidad α' de β -conglucina, el inhibidor 3 de la tripsina Kunitz y la lectina de semilla se convierten en mensajes muy abundantes en la población total de mRNA. Sobre esta base, el sistema de embriones somáticos de soja se comporta muy análogamente a los embriones cigóticos de soja en maduración *in vivo*, y es por tanto un sistema modelo satisfactorio y rápido para analizar los efectos fenotípicos de la modificación de la expresión de los genes en el camino de la biosíntesis de los ácidos grasos (véase la publicación PCT Núm. WO 2002/00904). El sistema modelo es también predictivo de la composición de ácidos grasos de las semillas de plantas derivadas de embriones transgénicos.

Ejemplo 7

Ensayo del Fenotipo de Lipoxigenasa y Resultados

Se llevaron a cabo transformaciones de *Glycine max* cv. Jack con cinco constructos que contenían secuencias artificiales de microRNA direccionadas contra las secuencias de lipoxigenasa bajo el control de un promotor específico de semilla. Podría esperarse que el amiRNA silenciara la totalidad de las tres lipoxigenasas específicas de semilla, dado que el mismo tiene una diferencia de sólo un pb respecto a las secuencias de lipoxigenasa 1 y lipoxigenasa 3, y dos cambios de pb respecto a la secuencia de lipoxigenasa 2. Después de la transformación, los embriones somáticos de soja se recogieron para uso en el ensayo de lipoxigenasas.

Preparación del Extracto de Embriones Somáticos de Soja

Se molieron individualmente embriones somáticos de soja en 500 μ l de taurodesoxicolato de sodio 2 mM en una placa de microtitulación (placas de microtitulación de 96 pocillos profundos con un volumen práctico de 1,2-2 ml por pocillo) utilizando una bola de molienda de acero de 4 mm o 5/32" por embrión. Los embriones se molieron con dos ciclos de 30-45 segundos a 1500 carreras/min utilizando un Geno/Grinder™ (SPEX CertiPrep, Metuchen, NJ). Las placas de microtitulación se centrifugaron luego utilizando una Centrífuga Eppendorf 5804R con rotor A-2-MTP a 4000 rpm durante 5 minutos para eliminar los residuos celulares.

Preparación del Extracto de Semillas de Soja a Granel

Se realizó también el ensayo enzimático LOX1 para ensayar semillas de soja cv Jack como control positivo para la actividad de lipoxigenasa y semillas que llevaban la mutación triple lox nula como control negativo para la actividad de lipoxigenasa. El ensayo sobre semillas múltiples se llevó a cabo como sigue. Se pusieron las semillas en un Geno/Grinder™ con una bola de acero inoxidable de 9/16 pulgadas (14,3 mm) que estaba colocada encima de las semillas. Las semillas se molieron utilizando el Geno/Grinder™ a 1600 rpm durante 30 segundos; se realizaron molindas adicionales de las semillas durante 30 segundos hasta que las semillas se hubieron pulverizado para dar un polvo homogéneo. Una pequeña cantidad (aproximadamente 10-15 mg) de polvo de soja pulverizado se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y el polvo de soja se suspendió, agitando vorticialmente, en 800 μ l de H₂O ddi estéril filtrada. Se invirtieron luego los viales que contenían las muestras y se dejaron sedimentar en el banco a la temperatura ambiente durante aproximadamente 2-3 minutos. Los residuos se compactaron por centrifugación utilizando una micro-centrífuga a la velocidad máxima.

45 Ensayo para LOX1 de Soja

Se determinó la actividad de lipoxigenasa utilizando un ensayo espectrofotométrico en el cual se somete linoleato de sodio a hidroperoxidación aumentando la absorbancia a 234 nm de la muestra. Cuando se mide la actividad de LOX1 en semillas de soja (*Glycine max* cv. Jack) la absorbancia a 234 nm aumenta en 1-3 minutos hasta aproximadamente 0,5 ó 0,6 OD 234 nm min⁻¹.

50 Se preparó el sustrato de linoleato de sodio a partir de ácido linoleico como sigue. Se pesaron 70 mg de ácido linoleico y 70 mg de Tween en un tubo de 50 ml y se homogeneizaron en 4 ml de H₂O estéril filtrada y doblemente desionizada (ddi). Se añadieron aproximadamente 0,55 ml de NaOH 0,5 N a fin de obtener una solución clara. Se añadió H₂O estéril filtrada y doblemente destilada para llevar la solución hasta 25 ml de volumen total. La solución se dividió en partes alícuotas de 2 ml que se guardaron a -20°C bajo argón gaseoso. La concentración de Stock final de linoleato de sodio era 10 mM.

Para medir la actividad de lipoxigenasa en embriones somáticos de soja o semillas de soja se añadieron primeramente 100 µl de linoleato de sodio 0,2 mM (18:2) en borato de sodio 0,1 M, pH 9,0 a una placa de microtitulación de 96 pocillos de grado estándar UV adecuada para un lector de placas de microtitulación; se añadieron luego 10 µl del extracto de soja a cada pocillo y se monitorizó el aumento de absorbancia a 234 nm durante 5 minutos con un intervalo de 9 segundos utilizando un lector de placas de microtitulación SpectraMax 190 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA).

El ensayo descrito en este ejemplo era específico para la detección de LOX1. No se observó actividad alguna de lipoxigenasa cuando este ensayo se realizó sobre semillas de un mutante de soja con mutaciones en los tres genes de semilla de lipoxigenasa expresados, mientras que se encontró un alto nivel de actividad en las semillas cv. Jack.

10 Tabla 5: Eficacia de Silenciación de los AmiRNAs

Constructo #	amiRNA	% Silenciación
PHP34018	156c-lox	0
PHP32803	159-lox	82
PHP34019	166b-lox	0
PHP31104	168c-lox	76
PHP37825	396b-lox	83
PHP34044	398b-lox	0

Estos resultados demuestran que los precursores de amiRNA son capaces de producir amiRNAs que son eficaces en la silenciación de genes.

Ejemplo 8

15 Ensayo del Fenotipo de Ácidos Grasos, y Resultados

Se llevaron a cabo transformaciones de Glycine max cv. Jack con tres constructos que contenían secuencias artificiales de microRNA direccionadas contra la desaturasa 2-1 de ácidos grasos bajo el control de un promotor específico de semilla. Se realizaron transformaciones adicionales de Glycine max cv. Jack con dos constructos que contenían dos secuencias de microRNA artificiales; una direccionada contra la desaturasa 2-1 de los ácidos grasos y la otra direccionada contra la desaturasa 2-2 de los ácidos grasos, ambas bajo el control del mismo promotor específico de semillas. Podría esperarse que la silenciación de la desaturasa 2-1 de los ácidos grasos condujera a niveles incrementados de embriones y semillas somáticos de ácido oleico en comparación con las semillas y embriones somáticos no transformados. Podría esperarse que la silenciación de la desaturasa 2-1 de los ácidos grasos y la desaturasa 2-2 de los ácidos grasos condujera a niveles incrementados de ácido oleico en embriones y semillas somáticos en comparación con los embriones y semillas somáticos no transformados. Después de la transformación, se recogieron los embriones somáticos de soja para uso en el ensayo de lipoxigenasa.

Se empleó el análisis CG de FAME para investigar si la expresión de amiRNA altera el perfil de ácidos grasos de los embriones somáticos de soja. Se analizaron aproximadamente 5 embriones somáticos por suceso y se analizaron 25-50 sucesos por constructo. Cada embrión somático se puso en un vial GC. Para la transesterificación, se añadieron 50 µl de hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH) al vial GC y se incubaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente mientras se agitaba. Se añadieron luego 0,4 ml de heptano al vial GC y se incubó durante 30 min a la temperatura ambiente mientras se agitaba mediante sacudidas. Se separaron los ésteres metílicos de ácidos grasos (5 µl inyectados desde la capa de heptano) y se cuantificaron utilizando un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard 6890 provisto de una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (Catálogo #24152, Supelco Inc.). La temperatura del horno se programó para mantenerse a 220°C durante 2,6 min, aumentar hasta 240°C a razón de 20°C/min y se mantuvo luego durante 2,4 min adicionales. El gas portador fue suministrado por un generador de hidrógeno Whatman. Los tiempos de retención se compararon con los correspondientes a los ésteres metílicos de estándares disponibles comercialmente (Nu-Chek Prep, Inc.). Un suceso se consideró silenciado si tres o más embriones somáticos acusaban niveles de ácido oleico mayores que 20%.

40 Tabla 6: Eficacia de Silenciación de los amiRNAs

Constructo #	amiRNA	% Silenciación
PHP32511	159-fad2-1b- -	26
PHP32421	166b-fad2-1b	0

PHP37826	168c-fad2-1b	0
PHP32510	396b-fad2-1b	30
PHP32843	396b-fad2-1b & 159-fad2-2	80
PHP32869	159-fad2-1b & 159-fad2-1b	80

Estos resultados muestran que algunos de los precursores de amiRNA son capaces de producir amiRNAs que son eficaces en la silenciación de genes.

Ejemplo 9

5 Generación y Análisis de Semillas con un Fenotipo Silenciado

Embriones desecados como los descritos en el Ejemplo 6 se germinaron y se regeneraron plantas. Las semillas de plantas transgénicas se cosecharon y se ensayaron respecto a actividad de lipoxigenasa como en el Ejemplo 7 o el contenido de ácidos grasos como en el Ejemplo 8. Los fenotipos obtenidos eran consistentes con los resultados obtenidos en los embriones transgénicos (datos no presentados). La proteína extraída de las semillas de las plantas transformadas con los constructos de lipoxigenasa se examinó utilizando análisis en gel de SDS-poliacrilamida. La lipoxigenasa es una proteína tan abundante que la banda puede identificarse visualmente en los geles teñidos utilizando como comparadores Jack (control de tipo salvaje) y un mutante que no produce lipoxigenasa de semilla. Las semillas transgénicas no exhibían producción visible alguna de lipoxigenasa en concordancia con los resultados obtenidos de los ensayos de lipoxigenasa (datos no presentados).

15 Se plantaron también semillas transgénicas en el invernadero y se dejó que las plantas se auto-fertilizaran. Las semillas se recogieron y analizaron respecto a actividad de lipoxigenasa como en el Ejemplo 7 o el contenido de ácidos grasos como en el Ejemplo 8. Este análisis demostró que el efecto de estos constructos es heredable y estable.

Ejemplo 10

Constructos para Silenciar fad2-1 y fatB

20 A veces es deseable silenciar más de un gen con un constructo dado. Los precursores individuales de amiRNA pueden enlazarse operativamente al mismo o diferentes promotores. Alternativamente, pueden enlazarse operativamente dos o más precursores de amiRNA unos a otros y enlazarse luego a un solo promotor. A partir de un constructo de este tipo podrían producirse dos o más amiRNAs. Tales constructos para silenciar fad2-1 y fad2-2 se describen en el Ejemplo 4 y el Ejemplo 8. Como un ejemplo adicional, se produjeron constructos para silenciar a la vez fad2-1 y fatB. Fad2-1 se ha descrito arriba. fatB es una tioesterasa que codifica una palmitoil-tioesterasa (Kinney, A.J. (1997) Genetic engineering of oilseeds for desired traits. En: Genetic Engineering, Vol. 19, (Setlow J.K. Plenum Press, Nueva York, NY, pp. 149-166.). La regulación decreciente de fatB podría dar como resultado niveles reducidos de ácidos grasos saturados, y fundamentalmente una reducción en palmitato, en tanto que la regulación decreciente de fad2-1 da como resultado niveles elevados de ácido oleico y una reducción en los ácidos grasos poliinsaturados.

35 La secuencia estrella de amiRNA para fad2-1 descrito en los Ejemplos 2 y 3 se utilizó y se convirtió en los precursores de amiRNA como se describe en el Ejemplo 4. Para fatB, el amiRNA se diseñó como se describe en el Ejemplo 2, el microRNA es 5'-ugcugcuuuuccccuuacc-3' (la secuencia de DNA correspondiente a este amiRNA se representa en SEQ ID NO: 40). Se diseñaron secuencias estrella artificiales como se describe en el Ejemplo 3 y se muestran en la Tabla 7. Se crearon precursores de amiRNA como se explica en el Ejemplo 4.

Tabla 7: Secuencias Estrella Artificiales de microRNA

Precursor de amiRNA	Secuencia Estrella	SEQ ID NO
159-fatB	gggtaagggggctaagcagcta	41
396b-fatB	gggcaagggggaaaagcagca	42

40 Estos precursores se clonaron aguas abajo de los precursores fad 2-1 (descritos en el Ejemplo 4) para crear las casetes descritas en la Tabla 8. Las casetes se clonaron aguas abajo de un promotor específico de embrión como se ha descrito previamente. La transformación de la soja se realizó como se describe en el Ejemplo 6 y los embriones se ensayaron respecto a fenotipo de ácidos grasos como se describe en el Ejemplo 8. Ningún embrión exhibía el fenotipo esperado para silenciación de fatB.

El examen de varios ESTs codificantes de fatB sugiere que muchos de los ESTs tienen una señal de poliadenilación aguas arriba de la secuencia complementaria al microRNA fatB, por lo que no podrían silenciarse. Alternativamente, se sabe que la estructura tridimensional del mRNA puede inhibir la escisión y por tanto la silenciación del gen (Long et al. (2007) Potent effect of target structure on microRNA function Nature Structural & Molecular Biology 14, 287 - 294. Publicado en línea: 1 de abril 2007), y es posible que la estructura tridimensional de fatB inhiba la función del amiRNA diseñado. Se han construido amiRNAs adicionales y están siendo testados.

Tabla 8: Constructos artificiales de miRNA que contienen amiRNAs diseñados para silenciar tanto a fad2-1 como a fatB

Número PHP	Casete
PHP33278	159-fad2-1/ 159-fatB
PHP33283	159-fad2-1 / 396b-fatB
PHP33284	396b-fad2-1/ 159-fatB
PHP33285	396b-fad2-1/ 396b-fatB

Ejemplo 11

10 Constructos para silenciar la fosfoglucomutasa (PGM)

Los ejemplos anteriores de muestran la silenciación de los genes de soja fad2-1, fad2-2 y lipoxigenasa, pero es sabido por los expertos en la técnica que pueden construirse amiRNAs para silenciar muchos genes. Como ejemplo de otro gen que puede silenciarse, se diseñó un amiRNA direccionado a fosfoglucomutasa (PGM, Patente US Núm. 7.323.560) como se describe en el Ejemplo 2, y la secuencia de DNA correspondiente a estos amiRNAs se muestra en la Tabla 9. Se diseñaron secuencias estrella artificiales como se describe en el Ejemplo 3 y se muestran en la Tabla 10. Se crearon precursores de amiRNA como se explica en el Ejemplo 4.

Tabla 9: Secuencias Artificiales de MicroRNA

Designación	MicroRNA artificial	SEQ ID NO
a	ttcmetaactctctccccgc	43
b	tcgccatcactccaacac	44
c	tccmetaaaattccaaccag	45
d	taaacttaataccccaatcat	46

Tabla 10: Secuencias Estrella Artificiales de MicroRNA

Precursor de amiRNA	Secuencia Estrella	SEQ ID NO
159-PGMa	gcggggaagaggttttgat	47
168c-PGMb	ctgtgtgaggtgatggccga	48
159-PGMc	ctggttggaaacctttgggt	49
159-PGMd	atgattggggtcataagttt	50

Se clonaron precursores de amiRNA aguas abajo de un promotor específico de embrión como se ha descrito previamente y los constructos se transformaron en soja como se describe en el Ejemplo 6. Las plantas de soja transgénicas en las cuales se ha silenciado PGM muestran un fenotipo de almidón reducido en los embriones de etapa tardía. La silenciación se determinó por un examen visual de embriones teñidos con yoduro de potasio. Alternativamente, se determinó también el almidón utilizando cromatografía de gases. Dos constructos produjeron silenciación de genes, mientras que los resultados están pendientes para los dos constructos restantes (Tabla 11).

Tabla 11: Los Constructos Artificiales de miRNA Silencian PGM

Constructo	% Silenciación
159-PGMa	22
168c-PGMb	33
159-PGMc	no disponible
159-PGMd	no disponible

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> E. I. Du Pont de Nemours and Company, Inc.
 <120> Regulación decreciente de la expresión génica utilizando microRNAs artificiales

5 <130> 27.13.106220/04
 <150> US 61/014,512
 <151> 18-12-2007
 <160> 50
 <170> PatentIn version 3.5

10 <210> 1
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>

15 <223> Iniciador 156cA
 <400> 1
 ggtacctcga gtttcatcaa agaaaataac ttctgaac 38
 <210> 2
 <211> 36

20 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador 156cS
 <220>

25 <221> característica_miscelánea
 <222> (18)..(18)
 <223> n is a, c, g, o t
 <400> 2
 ggatccatgg tagaatcnta cactttggta gccctg 36

30 <210> 3
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>

35 <223> Iniciador 159A
 <400> 3
 ggtacctcga gttctagcta gctagggttt gggtag 36

<210> 4
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Iniciador 159S
 <400> 4
 ggatccatgg agattgttt ataaaaatcc aacaatc 37
 <210> 5
 10 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Iniciador 166bA
 15 <400> 5 ggtacctcga ggtgcagatt gagagaaaga tgaaag 36
 <210> 6
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> iniciador 166bS
 <400> 6
 ggatccatgg ggaactata aggcttcgga ccagg 35
 <210> 7
 25 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> iniciador 168cA
 30 <400> 7
 ggtacctcga ggtgctcttt ataaataacc cctcg 35
 <210> 8
 <211> 34
 <212> DNA
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> iniciador 168cS

<400> 8
 ggatccatgg aattactttg acatagtagt atgc 34
 <210> 9
 <211> 37
 5 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> iniciador 396bA
 <400> 9
 10 ggtacctcga gcttatatat aacaagcca taaaatc 37
 <210> 10
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> iniciador 396bS
 <400> 10
 ggatccatgg gcgagaaact ttgatgggc atgg 34
 <210> 11
 20 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> iniciador 398bA
 25 <400> 11
 ggtacctcga gtatatttcc acaatgatgt tattcttac 39
 <210> 12
 <211> 38
 <212> DNA
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> iniciador 398bS
 <400> 12
 ggatccatgg gtttgctca tcaaatgtt cttcctag 38
 35 <210> 13
 <211> 847
 <212> DNA

<213> Glycine max

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (840)..(840)

5 <223> n is a, c, g, o t

<400> 13

```

tttcatcaaa gaaaataact tctgaactgt tcaaactgat ctcatgacaa ctgaaagaac    60
atagtctgca tacaatccat ttcattcctcc gcagcataat caattgtgct accacaacaa    120
gattgacagc aacaaaggac ccttattgaa agcttcaaca agttaagct ttaatcattg    180
gagtacacag tacacacaca aggttttgaa tccataatth cccaacaaag acataaccac    240
ttagttagct acctactccc acaagaaagg aagtgttagt gggctcctcat tttcaacaaa    300
tccatcgaga tccatttgca gcattccggt gtaatgaagg ttggttggtt ttgcatcgaa    360
aaccaatact tgaccactag gcttatctct ttccgtttct gagcatgcat actcattcac    420
agcatcaaaa tgcacagatc ctgatggaga ttgcacaggg caggtgatgc tagattgcac    480
cactactcaac tctggacttt gtgattgaag tgttgacaga agatagagag cacaacctga    540

gtcaaaggat ccaggttttg catctgtaga gagctttcgg ttgctctttc caccattga    600
tggggcgatg gtgccatgaa taggctgaca aatgggagtt cccggcattg cttcatcacc    660
actgcctact ttagggtcat tttcttgcca aagaggatgt cccttatctt gcttatgctt    720
gtcaattctg tataaaagtc gaggagaatc atgaccagat tcagctccag ttttggcagc    780
agcaggccac atgtctctca taatagggtt ggcataagcc tcagggttac caaagtgtan    840
gattcta                                           847

```

<210> 14

<211> 958

10 <212> DNA

<213> Glycine max

<400> 14

ES 2 421 031 T3

```

ttctagctag ctagggtttg ggtagtgagt gtaataaagt tgcaaagttt ttggttaggt    60
tacgttttga ccttattatt atagttcaaa gggaaacatt aattaaaggg gattatgaag    120
tggagctcct tgaagtccaa ttgaggatct tactgggtga attgagctgc ttagctatgg    180
atcccacagt tctaccatc aataagtgct tttgtggtag tcttgtggct tccatatctg    240
gggagcttca tttgcttta tagtattaac cttctttgga ttgaaggag ctctacaccc    300
ttctcttctt ttctctcata ataatttaa tttgttatag actctaaact ttaaagtgtt    360
tttttgaagt tttccgttt ttctctttt ccatgatccc gttcttgctg tggagtaacc    420
ttgtccgagg tatgtgcatg attagatcca tacttaattt gtgtgcatca cgaaggtag    480
gttgaatga actttgcttt tttgacctt taggaaagt cttttgttgc agtaatcaat    540
tttaattagt tttaattgac actattaact ttattgtcat ctttgttagt tttattgtt    600
aattgagtgc atatttccta gaaattctc ttacctaaca tttttatac agatctatgc    660
tcttgctctt tgccttact ctggccttg tgttggttat ttgtctacat atttattgac    720
tggtcgatga gacatgtcac aattcttggg cttatttgtt ggtctaataa aaggagtgt    780
tattgaaaga tcaagacgga gattcgggtt tatataaata aactaaagat gacatattag    840
tgtgttgatg tctcttcagg ataattttt tttgaaataa tatggtaatg tcttgtctaa    900
atgtgtgac ataattctta ctgattttt ggattgttg atttttataa acaaatct    958

```

<210> 15

<211> 394

<212> DNA

5 <213> Glycine max

400> 15

```

gggaactata aggcctcgga ccaggcttca ttcccctcaa aagttcttcc tttcatttgt    60
ttctacttca aacttcaaac acaagatcat gtgtgttgtg tgtggtgag aacttgacat    120
gcttcttctt cctagcttgc aaaggtagg ttgagaggaa tgttgtctgg ctcgaggta    180
tggaggagga ggaggagtag agtactgaga tcagtgaaag tttccaatgg aaatttacc    240
tcttacacaa aaaaatgatt ctgggaccag gcttcattcc ccccaccaa cttttgctt    300
ttccttaatt taaatttctt tctctccatt ttcatatctc gcatgccctt atggttaagg    360
ttctcttcc tttcatctt ctctcaatct gcac    394

```

<210> 16

<211> 1068

10 <212> DNA

<213> Glycine max

<400> 16

ES 2 421 031 T3

```
tctttataaa taaccctcg ctaaccceaat cttcaccctg tcaccacata tagtgtgggt 60
tggggttagc ttcgcgattc ttatttctct cttaactct ctctctctct cgtcctcgcg 120
gatggagaga gagaaagtaa gagagaaaga gcggtggttg gtggtttttg tttggtgaag 180
ttcgattcga tgcgatgcga ttgcgttggg gattttgatt ctctctctct cactgtgctg 240
tctctaattc gcttgggtca ggtcgggaac cggttttcgc gcggaatgga ggaacggtcg 300
ccggcggcga attggatccc gccttgcatc aactgaatcg gaggcgcgg tgaagctttg 360
cctcgttttc cgtcagatc tcactctcga gattctacca ccagtatttt ttaaatttat 420
tttaactctc gcttatcaga tccgaaacgc ttctagattt aagtttatcg tctctatgca 480
gaaagtgtga tttatgcggt agatcccgat gcatagaatc tacatctaag agaaacagtt 540
ttagttaaaa agcttctgat gtgcttttcc ctgttttga tttttacttg acctgcttcc 600
tttcattgat taataatcaa gctgaaattt ttgatatttg agaactgaaa taaataatct 660
tggatttatt acaataatga atttactgta tcggtatagg ttaagctaat tgaggtgatt 720
gcgattcgat tgggaaaaaa aaaacatttt ttaggttttc tgatggtttt tgagccttgg 780
ttgaattgaa ttgcatgccca cgggttgcgaag tgttttatgt gatgcattcc attgcgatgc 840
ttgtgcttat tctggttcga gctattttat attgtttgat attgctttta gaacagaagg 900
cttcaagtct atgaagcatt tgtaagtga ttgtgtagca ggaattgatg acctggttgg 960
ggcatgattt gagtatctgg ctctctgtgt aactagcttc tagacataga aaccaagtt 1020
aagacttgag gatggcttca aattgcatac tactatgtca aagtaatt 1068
```

<210> 17

<211> 574

<212> DNA

5 <213> Glycine max

<220>

<221> característica_misclánea

<222> (531)..(533)

<223> n is a, c, g, o t

10 <400> 17

```
gcgagaaaact ttgtatgggc atggttattt ctcacttctc accctccttt actttcttat 60
gctaaatcct ccttccccta tatctccacc ctcaaccctt tttctcatt ataactttg 120
gtgccttagat ggtgtgtgtg tgtgctgctg agagatctga gctcaatttt cctctctcaa 180
gtccttggca tgcttttcca cagctttctt gaacttctta tgcattctat atctctccac 240
ctccaggatt ttaagcccta gaagctcaag aaagctgtgg gagaatatgg caattcaggc 300
ttttaattgc tttcatttgg taccatcact tgcaagattt cagagtacaa ggtgaacaca 360
cacatcttcc tcttcatcaa ttctctagtt tcactcttat ctttctattc acggttaactc 420
tcactacctt ctttcatctt ataagttata ccgggggtgt gatgtgatg agtgtaaatt 480
aaatatatgt gatctcttcc tctggaaaaa ttttcagtgt gatatacata nnnatctctt 540
aatctagaga ttttatggct ttgttatata taag 574
```

<210> 18

<211> 463

15 <212> DNA

ES 2 421 031 T3

<213> Glycine max

<400> 18

```

gttttgctca ttcaaagtgt cttcctagtc aagtccaaat ggtttatctc agaggagtgg      60
atctgagaac acaaggetgg ttgcaactgc tatattatga tcgattggta taaggtgaat      120
ttactttgtg ttctcaggtc accccttga gccaacctgt tgacatatac caaaacatga      180
atccttctca ctttgcttct catctttttt taccaccaca tcttggtata atgtcttcag      240
atctcaggaa atggtgcagg ctggatttgt ggatgggata gacatcaatg ttgttatttt      300
tatacttcat tttttatact ttaatttcct ctatacctca cttttattgg agaaaaaaga      360
gaatagaaaa tagtgattt ctcttctttt tttcaatcaa agggagtgtt aggggaaaag      420
tttagaaaat ggcgtgtaag aataacatca ttgtggaaat ata                          463

```

<210> 19

5 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> amiRNA direccionada a lipoxigenasa

10 <400> 19

tcatcagtca tccatggaga c 21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

15 <213> Artificial

<220>

<223> amiRNAs direccionadas a la desaturasa de ácido graso 2-1b

<400> 20

tgagggaaaa gggttgagga a 21

20 <210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

25 <223> amiRNAs direccionadas a la desaturasa de ácido graso 2-2

<400> 21

tccacataaa tacactctct t 21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia estrella 156c-lox
 5 <400> 22
 caatccctgt tcgactgtac a 21
 <210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia estrella 159-lox
 <400> 23
 gtctccatgg agaactgatg t 21
 15 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Secuencia estrella 166b-lox
 <400> 24
 cactccattt atgactcttg a 21
 <210> 25
 <211> 21
 25 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia estrella 168c-lox
 <400> 25
 30 ctctccctgg atgactgttg a 21
 <210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia estrella 398b-lox
 <400> 26

gtcgccagtg gatgactgat ga 22
 <210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia estrella 159-fad2-1b
 <400> 27
 ttctcaacc caattccctc t 21
 10 <210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Secuencia estrella 166b-fad2-1b
 <400> 28
 cccctcaagg ctttcaatc a 21
 <210> 29
 <211> 21
 20 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia estrella 396b-fad2-1b
 <400> 29
 25 ttactcaacc ctttccctc a 21
 <210> 30
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia estrella 159-fad2-2
 <400> 30
 aagagagtgt acctatgtgg t 21
 <210> 31
 35 <211> 844
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Precursor de amiRNA 156c-lox

<400> 31

```

tttcatcaaa gaaaataact tctgaactgt tcaaactgat ctcattgaaa ctgaaagaac    60
atagttcgca tacaatccat ttcattcctcc gcagcataat caattgtgct accacaacaa    120
gattgacagc aacaaaggac ccttattgaa agcttcaaca agttaaagct ttaatcattg    180
gagtacacag tacacacaca aggttttgaa tccataatth cccaacaaag acataaccac    240
ttagttagct acctactccc acaagaaagg aagtgctagt gggctcctcat tttcaacaaa    300
tccatcgaga tccatttgca gcattccggt gtaatgaagg ttggttgttt ttgcatcgaa    360
aaccaatact tgaccactag gctcaatccc tgttcgactg tacacatact cattcacagc    420
atcaaaatgc acagatcctg atggagattg cacagggcag gtgatgctag attgcacat    480
actcaactct ggactttgtg attgaagtgt catcagtcac ccatggagac aacctgagtc    540
aaaggatcca ggttttgcat ctgtagagag ctttcggttg ctctttccac ccattgatgg    600
ggcgatggtg ccatgaatag gctgacaaat gggagttccc ggcattgctt catcaccact    660
gcctacttta gggtcatttt cttgccaaag aggatgtccc ttatcttgct tatgcttgtc    720
aattctgtat aaaagtcgag gagaatcatg accagattca gctccagttt tggcagcagc    780
aggccacatg tctctcataa tagggttggc ataagcctca gggctaccaa agtgtaggat    840
tcta    844

```

5

<210> 32

<211> 958

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> Precursor de amiRNA 159-lox

<400> 32

ES 2 421 031 T3

ttctagctag ctagggttg ggtagtgagt gtaataaagt tgcaaagttt ttggttaggt 60
 tacgttttga ccttattatt atagttcaaa gggaaacatt aattaaaggg gattatgaag 120
 gtctccatgg agaactgatg ttgaggatct tactgggtga attgagctgc ttagctatgg 180
 atcccacagt tctaccatc aataagtgct tttgtggtag tcttgtggct tccatctctg 240
 gggagcttca tttgcctta tagtattaac cttctcatca gtcacccatg gagaccaccc 300
 ttctcttctt ttctctcata ataatttaa tttgttatag actctaaact ttaaagtgtt 360
 tttttgaagt ttttccgttt ttctcttttg ccatgatccc gttcttctg tggagtaacc 420
 ttgtccgagg tatgtgatg attagatcca tacttaattt gtgtgcatca cgaaggtag 480
 gttgaaatga actttgcttt tttgacctt taggaaagt cttttgttgc agtaatcaat 540
 ttaatttagt ttaattgac actattactt ttattgtcat ctttgttagt tttattgttg 600
 aattgagtgc atatttccta ggaaattctc ttacctaaca tttttatac agatctatgc 660
 tcttggctct tgcccttact cttggccttg tgttggttat ttgtctacat atttattgac 720
 tggtcgatga gacatgtcac aattcttggg cttatttgtt ggtctaataa aaggagtgct 780
 tattgaaaga tcaagacgga gattcgggtt tatataaata aactaaagat gacatattag 840
 tgtgttgatg tctcttcagg ataatttttg tttgaaataa tatggtaatg tcttgtctaa 900
 atttgtgtac ataattctta ctgatttttt ggattgttgg atttttataa acaaatct 958

<210> 33

<211> 358

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> Precursor de amiRNA 166b-lox

<400> 33

tcaaaagttc ttcctttcat ttgtttctac ttcaaacttc aaacacaaga tcatgtgtgt 60
 tgtgtgtggg tgagaacttg acatgcttct tcttcctagc ttgcaaaggt gaggttgaca 120
 ctccatttat gactcttgag gtcatggagg aggaggagga gtagagtact gagatcagtg 180
 aaagtttcca atggaaattt accctcttac acaaaaaaat gattctcatc agtcatccat 240
 ggagaccac ccaacttttg ctttttcctt aatttaaatt tctttctctc cattttcata 300
 tctcgcgatgc ccttatggta aggctttctc ttcctttcat cttctctca atctgcac 358

10 <210> 34

<211> 1072

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> Precursor de amiRNA 168c-lox

<400> 34

```

gtgatcttta taaataaccc ctcgctaacc caatcttcac cggttcacca catatagtgt    60
gggtaggggt tagcttcgcg attcttattt ctctctttaa ctctctctct ctctcgtcct    120
cgcggatgga gagagagaaa gtaagagaga aagagcgggtg gttggtgggt ttggtttgggt    180
gaagttcgat tcgatgcgat gcgattgcgt tggggatttt gattctctct ctctcactgt    240
gcggtctcta attcatcagt catccatgga gacccggttt tcgcgcgga tggaggaacg    300
gtcgcgcgcg ccgaattggc tctccctgga tgactgttga atcggaggcc gcggtgaacc    360
tttgctcgt tttccgctca gatctcatct ccgagattct accaccagta ttttttaaat    420
ttattttaat ctctgcttat cagatccgaa acgcttctag atttaagttt atcgtctcta    480
tcgagaaagt gtgatttatg cggtagatcc cgatgcatag aatctacatc taagagaaac    540
agttttagtt aaaaagcttc tgatgtgctt tttccttggt tggattttta cttgacctgc    600
ttcctttcat tgattaataa tcaagctgaa atttttgata tttgagaact gaaataaata    660
atcttgatt tattacaata atgaatttac tgtatcggta taggttaagc taattgaggt    720
gattgcgatt cgattgggaa aaaaaaaca ttttttaggt tttctgatgg tttttgagcc    780

ttggttgaat tgaattgcat gccacgggtg caagtgtttt atgtgatgca ttccattgcg    840
atgcttgtgc ttattctggt tcgagctatt ttatattggt tgatattgct tttagaacag    900
aaggcttcaa gtctatgaag catttgtaag tgaattgtgt agcaggaatt gatgacctgt    960
ttggggcatg atttgatgat ctggctctct gtgtaactag cttctagaca tagaaacca    1020
agttaagact tgaggatggc ttcatattgc atactactat gtcaaagtaa tt          1072

```

<210> 35

<211> 463

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> Precursor de amiRNA 398b-lox

<400> 35

```

ttttgctcat tcaaatgttc ttcctagtca agtcctaatg gtttatctca ggtcgccagt    60
ggatgactga tgaaggctgg tttgcactgc tatattatga tcgattggta taaggatgaat    120
ttactttcat cagtcaccca tggagactga gccaacctgt tgacatatac caaaacatga    180
atccttctca ctttgcttct catctttttt taccaccaca tcttggtata atgtcttcag    240
atctcaggaa atggtgcagg ctggatttgt ggatggtata gacatcaatg ttgttatttt    300
tatacttcat tttttatact ttaatttcct ctatacctca cttttattgg agaaaaaaga    360
gaatagaaaa tagtggattt ctcttctttt tttcaatcaa agggagttgt aggggaaaag    420
tttagaaaat ggcgtgtaag aataacatca ttgtggaat ata          463

```

10

<210> 36

<211> 958

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Precursor de amiRNA 159-fad2-1b

<400> 36

```

ttctagctag ctagggtttg ggtagtgagt gtaataaagt tgcaaagttt ttggttaggt    60
tacgttttga ccttattatt atagttcaaa gggaaacatt aattaaagg gattatgaag    120
ttcctcaacc caatccctc ttgaggatct tactgggtga attgagctgc ttagctatgg    180
atcccacagt tctaccctc aataagtct tttgtggtag tcttgggct tccatctctg    240
gggagcttca tttgccttta tagtattaac cttctgaggg aaaagggtt aggaacacc    300
ttctctctt ttctctcata ataatttaa tttgttatag actctaaact ttaaatgtt    360
tttttgaagt ttttccggtt ttctctttt ccatgatccc gttcttctg tggagtaacc    420
ttgtccgagg tatgtgcatg attagatcca tacttaattt gtgtgcatca cgaagggtgag    480
gttgaaatga actttgcttt tttgacctt taggaaagt cttttgttgc agtaatcaat    540
tttaattagt ttaattgac actattactt ttattgtcat ctttgttagt tttattgtt    600

aattgagtgc atatttccta gaaattctc ttacctaaca tttttatac agatctatgc    660
tcttggctct tgccttact cttggccttg tgttggttat ttgtctacat atttattgac    720
tggtcgatga gacatgtcac aattcttggg cttatttgtt ggtctaataa aaggagtgct    780
tattgaaaga tcaagacgga gattcggttt tatataaata aactaaagat gacatattag    840
tgtgttgatg tctcttcagg ataattttt tttgaaataa tatggtaatg tcttgtctaa    900
at ttgtgttac ataattctta ctgattttt ggattgttgg atttttataa acaaatct    958

```

5

<210> 37

<211> 358

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> Precursor de amiRNA 166b-fad2-1b

<400> 37

```

tcaaaagttc ttcctttcat ttgtttctac ttcaaacttc aaacacaaga tcatgtgtgt    60
tgtgtgtggt tgagaacttg acatgcttct tcttcctagc ttgcaaaggt gaggttgacc    120
cctcaaggct tttcaatcag gtcattggagg aggaggagga gtagagtact gagatcagtg    180
aaagtttcca atggaattt accctcttac acaaaaaaat gattctgagg gaaaagggtt    240
gaggaaccac ccaacttttg ctttttcctt aatttaaatt tctttctctc cattttcata    300
tctcgcagtc cttatggta aggctttctc ttcctttcat ctttctctca atctgcac    358

```

<210> 38

15

<211> 604

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Precursor de amiRNA 396b-fad2-1b

<400> 38

```

gcgagaaact ttgtatgggc atggttattt ctcacttctc accctccttt actttcttat    60
gctaaatcct ccttccccta tatctccacc ctcaaccctt ttttctcatt ataacttttg    120
gtgcctagat ggtgtgtgtg tgtgcgcgcg agagatctga gctcaatfff cctctctcaa    180
gtcctgggtca tgctttgagg gaaaagggtt gaggaactta tgcattctat atctctccac    240
ctccaggatt ttaagcccta gttactcaac ccttttccct cagaatattg caattcaggc    300
ttttaattgc tttcatttgg taccatcact tgcaagattt cagagtacaa ggtgaacaca    360
cacatcttcc tcttcatcaa ttctctagtt tcatccttat cttttcattc acggtaactc    420
tcactaccct ctttcatctt ataagttata ccgggggtgt gatgttgatg agtgtaaatt    480
aaatatatgt gatctcttcc tctggaaaaa ttttcagtgt gatatacata ataatctctt    540
aatctagaga ttttatggct ttgttatata taagcggcca attctgcaga tatccatcac    600
actg    604

```

5

<210> 39

<211> 958

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> Precursor de amiRNA 159-fad2-2

<400> 39

ES 2 421 031 T3

ttctagctag ctagggtttg ggtagtgagt gtaataaagt tgcaaagttt ttggtaggt 60
 tacgttttga ccttattatt atagttcaaa gggaaacatt aattaaagg gattatgaag 120
 aagagagtgt acctatgtgg ttgaggatct tactgggtga attgagctgc ttagctatgg 180
 atcccacagt tctacccatc aataagtgct tttgtggtag tcttgtggct tccatatctg 240
 gggagcttca tttgccttta tagtattaac cttctccaca taaatacaact ctcttcacc 300
 ttctcttctt ttctctcata ataatttaa tttgttatag actctaaact ttaaagtgtt 360
 tttttgaagt ttttccgttt ttctcttttg ccatgatccc gttcttctg tggagtaacc 420
 ttgtccgagg tatgtgcatg attagatcca tacttaattt gtgtgcatca cgaagggtgag 480
 gttgaaatga actttgcttt tttgacctt taggaaagt cttttgttgc agtaatcaat 540
 ttaattagt ttaattgac actattactt ttattgtcat ctttgttagt tttattgtt 600
 aattgagtgc atatttcta ggaaattctc ttacctaaca tttttatac agatctatgc 660
 tcttggctct tgccttact cttggccttg tgttggttat ttgtctacat atttattgac 720
 tggtcgatga gacatgtcac aattcttggg cttatttgtt ggtctaataa aaggagtgct 780
 tattgaaaga tcaagacgga gattcggttt tatataaata aactaaagat gacatattag 840
 tgtgttgatg tctcttcagg ataatttttg tttgaaataa tatggtaatg tcttgtctaa 900
 atttgtgtac ataattctta ctgatttttt ggattgttgg atttttataa acaaactc 958

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> amiRNA direccionada a fatB

<400> 40

tgctgctttt ccccttacc c 21

10 <210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia estrella 159-fatB

<400> 41

gggtaagggg gctaagcagc ta 22

<210> 42

<211> 22

20 <212> DNA

<213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia estrella 396b-fatB
 <400> 42
 gggttaagggg gctaagcagc ta 22
 5 <210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> amiRNA direccionada a PGMa
 <400> 43
 ttcaaaaact ctctccccg c 21
 <210> 44
 <211> 21
 15 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> amiRNA direccionada a PGMb
 <400> 44
 20 tcgcccata cctccaaca c 21
 <210> 45
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> amiRNA direccionada a PGMc
 <400> 45
 tcccaaaaaa ttccaacca g 21
 <210> 46
 30 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> amiRNA direccionada a PGMd
 35 <400> 46
 taaactaat accccaatca t 21
 <210> 47

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Secuencia estrella 159-PGMa
 <400> 47
 gcggggaaga ggttttgga t 21
 <210> 48
 <211> 21
 10 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia estrella 168c-PGMb
 <400> 48
 15 ctgttgtag gtgatggccg a 21
 <210> 49
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia estrella 159-PGMc
 <400> 49
 ctggttgaa acctttggg t 21
 <210> 50
 25 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia estrella 159-PGMd
 30 <400> 50
 atgattggg tcataagtt t 21

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un fragmento de ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de desoxirribonucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 16 en donde (i) los nucleótidos 249 a 269 de SEQ ID NO: 16 están reemplazados por una primera subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre 19 y 24 nucleótidos dependiendo de una secuencia diana cuya expresión debe reducirse, (ii) los nucleótidos 316 a 336 de SEQ ID NO: 16 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre 19 y 24 nucleótidos, siendo dicha segunda subsecuencia variable de nucleótidos capaz de hibridarse a la primera subsecuencia variable, y (iii) el miRNA precursor producido por dicho fragmento aislado de ácido nucleico tiene la misma estructura troncal que el miRNA precursor producido por SEQ ID NO: 16 endógena.
- 10 2.- Un constructo recombinante que comprende el fragmento de ácido nucleico aislado de la reivindicación 1 enlazado operativamente a al menos una secuencia reguladora.
- 3.- Una célula vegetal que comprende el constructo recombinante de la reivindicación 2.
- 4.- La célula vegetal de la reivindicación 3 en donde la célula vegetal es una célula de planta monocotiledónea.
- 15 5.- Un método para reducir la expresión de una secuencia diana en una célula vegetal, comprendiendo dicho método:
- 20 (a) transformar al menos una célula de planta con un constructo de ácido nucleico que comprende la secuencia de desoxirribonucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 16 en donde (i) los nucleótidos 249 a 269 de SEQ ID NO: 16 están reemplazados por una primera subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre 19 y 24 nucleótidos dependiendo de una secuencia diana cuya expresión debe reducirse, (ii) los nucleótidos 316 a 336 de SEQ ID NO: 16 están reemplazados por una segunda subsecuencia variable de nucleótidos de tamaño comprendido entre 19 y 24 nucleótidos, siendo dicha segunda subsecuencia variable de nucleótidos capaz de hibridarse a la primera subsecuencia variable, y (iii) el miRNA precursor producido por dicho fragmento aislado de ácido nucleico tiene la misma estructura troncal que el miRNA precursor producido por SEQ ID NO: 16 endógena; y
- 25 (b) seleccionar aquella o aquellas células vegetales transformadas cuyo nivel de expresión de la secuencia diana es reducido cuando se compara con el nivel de expresión de la secuencia diana en una célula de la planta de tipo salvaje.
- 6.- El método de la reivindicación 5 en donde la célula vegetal es una célula de planta monocotiledónea.
- 7.- Un mRNA artificial transcrito a partir del fragmento de ácido nucleico aislado de la reivindicación 1.