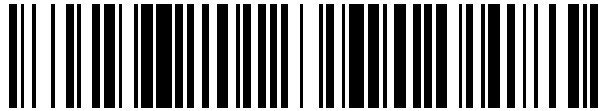


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 671**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2005 E 11196085 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2444497**

54 Título: **Silenciamiento de genes**

30 Prioridad:

**24.09.2004 US 612638 P**

**20.10.2004 US 619959 P**

**16.02.2005 US 653609 P**

**05.04.2005 US 668071 P**

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

**04.03.2015**

73 Titular/es:

**J.R. SIMPLOT COMPANY (100.0%)  
Suite 1300, One Capital Center, 999 Main Street  
Boise, ID 83702, US**

72 Inventor/es:

**ROMMENS, CAIUS M.T.;  
YAN, HUA;  
BOUGRI, OLEG y  
SWORDS, KATHY M.M.**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 530 671 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

Silenciamiento de genes

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con constructos únicos para producir un producto de ácido nucleico que subregula o evita la expresión de un polinucleótido objetivo deseado.

Antecedentes de la invención

10 La supresión de la expresión genética puede ser lograda por constructos que disparan silenciamiento de genes postranscripcional o transcripcional. Estos mecanismos de silenciamiento pueden subregular la expresión de polinucleótidos o genes deseados por modificación de la cromatina, escisión del ARN, represión translacional, o a través de mecanismos hasta ahora desconocidos, véase Meister G. and Tuschl T., Nature, vol.431, pp. 343-349, 2004.

15 Un constructo que es típicamente utilizado en este aspecto contiene un polinucleótido deseado, el cual comparte identidad de secuencia con al menos una parte de un gen objetivo que está operablemente enlazado a un promotor y a un terminador. Como es bien evidente, el promotor inicia la transcripción, mientras que el terminador termina la transcripción en un sitio específico y subsecuentemente media en la poliadenilación. Tal procesamiento de transcripto es importante para la estabilidad del transcripto y su transporte desde el núcleo y hacia el citoplasma.

20 En este aspecto, el terminador juega un papel importante en los constructos convencionales para silenciamiento de genes. Por ejemplo, la WO 99/53050 describe un constructo que comprende un promotor, un polinucleótido que comprende una primera secuencia con homología a un gen objetivo y una segunda secuencia que es inversa complementaria al gen objetivo, y un terminador. Un terminador de constructos convencional no necesariamente tiene que estar posicionado inmediatamente corriente abajo a partir del polinucleótido deseado. Por ejemplo, Mette y colaboradores describen un plásmido que contiene un polinucleótido deseado que está separado de un terminador operativamente enlazado mediante un gen de higromicina (Mette et al., EMBO J 18:241-8, 1999; Mette et al., EMBO J 19: 5194-201, 2000).

25 Otros constructos convencionales diseñados para silenciar genes contienen un polinucleótido en la orientación sentido o antisentido entre el promotor y el terminador. Tal constructo silenciador de genes convencional produce típicamente transcritos de ARN que son similares en tamaño, determinados por la distancia desde el inicio de la transcripción al sitio de escisión de la terminación y la cola poliadenilada.

30 La presente invención se relaciona con nuevas estrategias y constructos para silenciamiento de genes que son en general más efectivas que los constructos convencionales. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con nuevas estrategias y constructos para el silenciamiento de genes utilizando un polinucleótido que no está enlazado operativamente a un promotor y un terminador pero que en vez de esto está enlazado operativamente a dos promotores orientados convergentemente.

Resumen de la invención

35 Estrategias y constructos pueden ser caracterizados por ciertas características. Un constructo, por ejemplo, puede no comprender una región de ADN, tal como un terminador, que está involucrado en la formación del extremo 3' y la poliadenilación. Alternativamente, el constructo puede comprender un terminador no funcional que es de manera natural no funcional o que ha sido modificado o mutado para hacerse no funcional.

40 Un constructo puede ser caracterizado también por la disposición de promotores a cada lado del polinucleótido deseado. Por lo tanto, un constructo puede comprender dos o más promotores que flanquean uno o más polinucleótidos deseados o que flanquea copias de un polinucleótido deseado, de tal manera que se transcriben ambas cadenas del polinucleótido deseado. Esto es un promotor puede estar orientado para iniciar la transcripción del extremo 5' de un polinucleótido deseado, mientras que un segundo promotor puede estar orientado operativamente para iniciar la transcripción desde el extremo 3' del mismo polinucleótido deseado. Los promotores orientados opuestamente pueden flanquear copias múltiples del polinucleótido deseado. Por lo tanto, el "número de copias" puede variar de tal manera que un constructo puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, o más de 100 copias, o cualquier entero intermedio, de un polinucleótido deseado finalmente flanqueado por promotores que están orientados para inducir la transcripción convergente.

45 Alternativamente, un primer promotor puede estar enlazado operativamente a un primer polinucleótido en el "casete A", por ejemplo, y un segundo promotor puede estar enlazado operativamente a un segundo polinucleótido, por ejemplo, "casete B". Los polinucleótidos de cada casete pueden o pueden no comprender la misma secuencia de nucleótidos, pero pueden compartir algún porcentaje de identidad de secuencia con un ácido nucleico objetivo de interés. Los casetes pueden ser dispuestos aleatoriamente, esto es, de tal forma que son adyacentes uno a otro en el constructo. Adicionalmente, el casete B, por ejemplo, puede estar orientado en la orientación complementaria inversa al casete A.

En esta disposición, por lo tanto, la transcripción a partir del promotor del casete B procederá en la dirección hacia el promotor del casete A. Por lo tanto, los casetes están dispuestos para inducir "transcripción convergente".

Si ningún casete comprende una secuencia de terminador, entonces tal constructo, en virtud de la disposición de transcripción convergente, puede producir transcritos de ARN que son de longitudes diferentes.

5 En esta situación, por lo tanto, pueden existir subpoblaciones de transcritos de ARN parcial o completamente transcritas que comprenden secuencias de longitud parcial o completa del polinucleótido transcrito deseado a partir del casete respectivo. Alternativamente, en la ausencia de un terminador funcional, la maquinaria de transcripción puede proceder después del final de un polinucleótido deseado para producir un transcrito que es más largo que la longitud del polinucleótido deseado.

10 En un constructo que comprende dos copias de un polinucleótido deseado, por lo tanto, donde uno de los polinucleótidos puede o puede no estar orientado en la dirección complementaria inversa al otro, y donde los polinucleótidos están enlazados operativamente a promotores para inducir la transcripción convergente, y no hay un terminador funcional en el constructo, la maquinaria de transcripción que se inicia desde un polinucleótido deseado puede proceder a transcribir la otra copia del polinucleótido deseado y viceversa. Las copias múltiples del polinucleótido deseado pueden estar orientadas en diversas permutaciones: en el caso donde dos copias del polinucleótido deseado están presentes en el constructo, las copias pueden, por ejemplo, estar orientadas en la misma dirección, en la orientación inversa una a otra, o en la orientación complementaria inversa una a otra, por ejemplo.

20 En una disposición en donde uno de los polinucleótidos deseados está orientado en la orientación complementaria inversa del otro polinucleótido, puede ser producido un transcrito de ARN que comprende no solamente la secuencia "en sentido" del primer polinucleótido sino también la secuencia "antisentido" del segundo polinucleótido. Si el primero y segundo polinucleótidos comprende las mismas o sustancialmente las mismas secuencias de ADN, entonces el transcrito de ARN individual puede comprender dos regiones que son complementarias una a otra y que pueden, por lo tanto, fusionarse. Por lo tanto, el transcrito de ARN individual que es transcrito de esta manera, puede formar una estructura dúplex de horquilla parcial o completa.

25 Por otro lado, si se produjeran dos copias de tal transcrito largo, una de cada promotor, entonces existirían dos moléculas de ARN, cada una de las cuales compartiría regiones de complementariedad de secuencias con la otra. Por lo tanto, la región "en sentido" del primer transcrito de ARN puede fusionarse a la región "antisentido" del segundo transcrito de ARN y viceversa. En esta disposición, por lo tanto, puede formarse otro dúplex de ARN el cual consiste de dos transcritos de ARN separados, en oposición a un dúplex en horquilla que se forma a partir de un transcrito de ARN individual autocomplementario.

30 Alternativamente, dos copias del polinucleótido deseado pueden estar orientadas en la misma dirección de tal manera que, en el caso de lectura a través de la transcripción, el transcrito de ARN largo que es producido a partir de un promotor puede comprender, por ejemplo, la secuencia en sentido de la primera copia del polinucleótido deseado y también la secuencia en sentido de la segunda copia del polinucleótido deseado. El transcrito de ARN que es producido a partir del otro promotor orientado de manera convergente, por lo tanto, puede comprender la secuencia antisentido de la segunda copia del polinucleótido deseado y también la secuencia antisentido del primer polinucleótido. De acuerdo con lo anterior, es probable que ningún transcrito de ARN contenga regiones de complementariedad exacta y, por lo tanto, ningún transcrito de ARN probablemente va a plegarse sobre sí mismo para producir una estructura de horquilla. Por otro lado los dos transcritos de ARN individuales podrían hibridar y fusionarse uno a otro para formar un dúplex de ARN.

En un primer aspecto de la invención, se provee un constructo de transformación de plantas, que comprende al menos dos copias de un polinucleótido deseado enlazado operativamente a elementos reguladores, en donde el polinucleótido deseado comprende una secuencia a partir del promotor de un gen objetivo pero ninguna secuencia localizada corriente abajo del inicio de la transcripción del gen objetivo.

45 La presente divulgación provee un constructo que carece de un terminador o carece de un terminador que este precedido por una región de ADN que codifica ribozima autodivisible, pero que comprende un primer promotor que esta enlazado operativamente a un primer polinucleótido y un segundo promotor que esta enlazado operativamente al segundo polinucleótido, con lo cual (1) el primero y segundo polinucleótidos comparten al menos una identidad de secuencia uno con otro, (2) el primer promotor está orientado de tal manera que la dirección de transcripción iniciada por este promotor procede hacia el segundo promotor, y viceversa, y (3) esta disposición convergente produce un rango de transcritos de ARN que generalmente son diferentes en longitud.

50 Los polinucleótidos deseados pueden ser repeticiones perfectas o imperfectas uno de otro, o repeticiones complementarias inversas perfectas o imperfectas una de otra. En el caso de un constructo que comprende un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, el segundo polinucleótido puede ser completa o parcialmente idéntico en la secuencia de nucleótidos al primer polinucleótido y orientado en la orientación complementaria directa o inversa con respecto al primer polinucleótido. Por lo tanto, el primero y segundo polinucleótidos pueden ser repeticiones perfectas uno del otro. Por otro lado, el segundo polinucleótido puede ser una repetición imperfecta del primer polinucleótido, esto

es el segundo polinucleótido puede compartir identidad de secuencia con el primer polinucleótido, pero no es total o parcialmente idéntico en secuencia, esto es, el segundo polinucleótido es una repetición imperfecta. Ese segundo polinucleótido también puede estar orientado como una repetición directa o posicionada en la orientación complementaria inversa con respecto al primer polinucleótido.

5 Cualquiera de los polinucleótidos descritos aquí, tal como un polinucleótido deseado, o un primero o segundo polinucleótidos, por ejemplo, pueden ser idénticos a al menos una parte de la secuencia objetivo, o pueden compartir identidad de secuencia con al menos una parte de una secuencia objetivo. Cuando un polinucleótido deseado comprende una secuencia que es homóloga a un fragmento de una secuencia objetivo, esto es, comparte identidad de secuencia con "al menos una parte de" una secuencia objetivo, puede ser deseable entonces que la secuencia de nucleótido del fragmento sea específica al fin objetivo y/o la secuencia parcial perfecta o imperfecta del objetivo que está presente en el polinucleótido deseado es de longitud suficiente para conferir especificidad al objetivo. Por lo tanto la porción del polinucleótido deseado que comparte identidad de secuencia con una parte de una secuencia objetivo puede comprender un dominio, sitio de enlazamiento o secuencia de nucleótidos característicos conservados típicamente por isoformas u homólogos de la secuencia objetivo. Es posible, por lo tanto diseñar un polinucleótido deseado que sea óptima para direccionar un ácido nucleico objetivo en una célula.

El polinucleótido deseado puede comprender una secuencia de preferiblemente entre 4 y 5,000 nucleótidos, más preferiblemente entre 50 y 1,000 nucleótidos y lo más preferiblemente entre 150 y 500 nucleótidos que comparten identidad de secuencia con la secuencia de ADN o ARN de un ácido nucleico objetivo. El polinucleótido deseado puede compartir identidad de secuencia con al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500, o más de 500 nucleótidos contiguos, o cualquier entero entre ellos, que son 100% idénticos en secuencia con una secuencia en una secuencia objetivo, o un polinucleótido deseado comprende una secuencia que comparte aproximadamente 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60%, 59%, 58%, 57%, 56%, 55%, 54%, 53%, 52%, 51%, 50%, 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 8%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% de identidad de secuencia de nucleótido con una secuencia de la secuencia objetivo. En otras palabras el polinucleótido deseado puede ser homólogo a o compartir homología con la secuencia de longitud completa de una secuencia objetivo o de un fragmento de la misma de una secuencia objetivo.

Por lo tanto, la presente divulgación provee una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que comparte homología con una secuencia objetivo y la cual, puede hibridar bajo condiciones de hibridación restrictivas o moderadas a una porción de una secuencia objetivo descrita aquí. Por un polinucleótido que hibrida a una "porción" de un polinucleótido se entiende un polinucleótido (bien sea ADN o ARN) que hibrida a al menos aproximadamente 15 nucleótidos, y más preferiblemente al menos aproximadamente 20 nucleótidos, y todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 30 nucleótidos, e incluso más preferiblemente más de 30 nucleótidos del polinucleótido de referencia. Para el propósito de la invención, dos secuencias que comparten homología, esto es como un polinucleótido deseado y una secuencia objetivo, pueden hibridar cuando forman un complejo de doble cadena en una solución de hibridación de 6X SCC, SDS al 0.5%, 5x de solución de Denhardt y 100 µg del ADN portador no específico. Véase Ausubel et al., sección 2.9, suplemento 27 (1994). Tal secuencia puede hibridar a "restricción moderada", la cual se define como una temperatura de 60°C en una solución de hibridación de 6X SSC, SDS al 0,5%, 5X solución de Denhardt y 100 µg de ADN portador no específico. Para hibridación a "alta restricción", la temperatura se incrementa a 68°C. Después de la reacción de hibridación con restricción moderada, los nucleótidos son lavados en una solución de 2X SCC más SDS al 0.05% por cinco veces a temperatura ambiente, con lavados subsecuentes con 0.1X SSC más SDS al 0.1% a 60°C durante 1 hora. Para alta restricción, la temperatura de lavado se incrementa a típicamente una temperatura que es aproximadamente 68°C. Los nucleótidos hibridados pueden ser aquellos que son detectados utilizando 1 ng de una sonda radiomarcada que tiene una radioactividad específica de 10,000 cpm/ng, cuando los nucleótidos hibridados son claramente visibles después de la exposición a una película de rayos X a -70°C durante no más de 72 horas.

El constructo puede comprender un casete de expresión que produce un ácido nucleico que reduce el nivel de expresión de un gen objetivo que es expresado normalmente por una célula que contiene el constructo, en 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60%, 59%, 58%, 57%, 56%, 55%, 54%, 53%, 52%, 51%, 50%, 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 8%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% en comparación con una célula que no contiene el constructo.

Cualquier polinucleótido, sea un "polinucleótido deseado" un "primer polinucleótido" un "segundo" polinucleótido puede compartir un cierto porcentaje de identidad de secuencia con una secuencia objetivo. Como se explica aquí, una secuencia objetivo puede ser, pero no limitarse a, una secuencia, de longitud parcial o completa, de un gen, elemento regulador, tal como un promotor o terminador, exón, intrón, una región no traducida, o cualquier secuencia corriente

- 5 arriba o corriente abajo de una secuencia genómica objetivo. De acuerdo con lo anterior, un polinucleótido puede comprender una secuencia que es idéntica a lo largo de la longitud de esa secuencia hasta tal secuencia objetivo. Por otro lado, el polinucleótido puede comprender una secuencia que comparte identidad de secuencia con tal secuencia objetivo. Por lo tanto, un polinucleótido deseado puede compartir aproximadamente 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, o 60% de identidad de secuencia de nucleótido con una secuencia de secuencia objetiva.
- 10 Un polinucleótido deseado puede comprender una secuencia que es derivada de un promotor objetivo. El promotor objetivo bien puede estar presente de manera natural en un genoma de una célula, esto es, el promotor objetivo es endógeno al genoma de la célula, o puede ser introducido en ese genoma a través de transformación. El promotor derivado del polinucleótido puede ser funcionalmente activo y contener una caja TATA o una secuencia similar a caja TATA pero nunca la transcripción ni comienza ninguna secuencia transcritas más allá de la transcripción. Alternativamente, el promotor deseado del polinucleótido puede ser funcionalmente inactivo, por ejemplo, en ausencia de una caja TATA. Tal promotor derivado puede representar solamente parte del promotor objetivo.
- 15 El polinucleótido deseado puede comprender una secuencia que es específica a un intrón que es endógeno a un genoma celular.
- El polinucleótido deseado puede comprender una secuencia que es parte de un terminador que es endógeno a un genoma celular.
- 20 El constructo puede comprender dos promotores idénticos que son funcionalmente activos en un tejido objetivo. El constructo puede comprender dos promotores diferentes, cada uno de los cuales es funcionalmente activo en un tejido objetivo.
- 25 Un constructo puede comprender adicionalmente uno o más polinucleótidos adicionales entre el casete A y el casete B. Por ejemplo, en la orientación 5' a 3', un constructo puede comprender (i) un primer promotor, (ii) un polinucleótido deseado, (iii) un espaciador de polinucleótidos adicional, por ejemplo, un intrón, (iv) la copia complementaria inversa del polinucleótido deseado, y (v) un segundo promotor, en donde el primero y segundo promotores están enlazados operativamente al polinucleótido deseado y la copia complementaria, respectivamente, y están orientados para inducir una transcripción convergente.
- 30 El polinucleótido espaciador adicional puede ser de cualquier longitud. Esto es, el polinucleótido espaciador puede ser un intrón que tiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500, o más de 500 nucleótidos o cualquier entero entre ellos de longitud. Si el polinucleótido espaciador entre dos polinucleótidos deseados es lo suficientemente largo, la transcripción puede nunca proceder del promotor al otro. Esto es, por cualquier razón, la transcripción puede detenerse mientras que la maquinaria de transcripción está localizada en el espaciador que no contiene un elemento terminador activo funcionalmente.
- 35 De acuerdo con lo anterior, el transcrita resultante puede comprender la secuencia de longitud completa de un primer nucleótido deseado y una secuencia parcial del intrón, pero no una parte del segundo nucleótido deseado. Así, puede ser posible diseñar un constructo tal como se describe aquí con un polinucleótido espaciador que evite que la transcripción proceda de un polinucleótido deseado al otro. En tal situación, si uno de los polinucleótidos deseados está orientado como una copia complementaria inversa del otro, entonces la prevención de la lectura a través de la
- 40 transcripción evitaría, por lo tanto, la síntesis de un transcrito de ARN que sea autocomplementario.
- De acuerdo con lo anterior, dependiendo de cualquiera de (i) la disposición convergente de promotores y polinucleótidos deseados, (ii) el número de copias de los polinucleótidos deseados, (iii) la ausencia de una región de terminación a partir del constructo, y (iv) la complementariedad y longitud de los transcritos resultantes, pueden producirse diversas poblaciones de moléculas de ARN a partir de los presentes constructos.
- 45 Por lo tanto, un constructo individual puede producir (i) un transcrito de ARN "en sentido" de cadena sencilla (ii) un transcrito de ARN "antisentido" de cadena sencilla, (iii) un dúplex de horquilla formado por un transcrito de ARN de cadena sencilla que se fusiona así mismo, o (iv) un dúplex de ARN formado a partir de dos transcritos de ARN distintos que se fusionan uno a otro. Un constructo individual puede ser diseñado para producir solamente transcritos de ARN en sentido o solamente antisentido a partir de cada promotor puesto de manera convergente.
- 50 La presente divulgación también describe un método para reducir la expresión de un gen que normalmente es capaz de ser expresado en una célula vegetal, incorporando de manera estable cualquiera de los constructos descritos aquí en el genoma de una célula.
- 55 En este aspecto, cualquier tipo de célula de cualquier especie puede ser expuesta o transformada de manera estable o transiente con un constructo. Por lo tanto, una célula bacteriana, una célula viral, una célula fúngica, una célula de algas, una célula de gusano, una célula vegetal, una célula de insecto, una célula de réptil, una célula de ave, una célula de pez o una célula de mamífero puede ser transformada con un constructo. La secuencia objetivo, por lo tanto, puede

- 5 estar localizada en el núcleo o en un genoma de cualquiera de tales tipos de células. La secuencia objetivo, por lo tanto, puede estar localizada en un gen en el genoma de la célula. Por lo tanto, la secuencia objetivo puede estar localizada en al menos uno de los elementos reguladores del gen, un exón del gen, un intrón del gen, la región 5´ no traducida al gen, o la región 3´ no traducida al gen. El elemento regulador del gen puede ser al menos uno del promotor o un elemento potenciador del gen.
- Alternativamente, la secuencia objetivo puede estar localizada en un transcripto de ARN que está presente en una de estas células y que puede o no ser producido normalmente por la célula. Esto es, el transcripto de ARN que comprende la secuencia objetivo puede ser producido a partir de una fuente que es foránea a la célula anfitriona. Por ejemplo, el transcripto de ARN que comprende la secuencia objetivo puede ser de origen viral pero existe en una célula vegetal.
- 10 La presente divulgación también contempla la exposición e integración in vitro, ex vivo, ex planta e in vivo del constructo deseado en un genoma celular o en preparaciones de ácidos nucleicos aislados.
- Los constructos, por ejemplo, pueden ser insertados en plásmidos de transformación derivados de Agrobacterium que contienen los elementos de frontera de T-ADN requeridos para las células de plantas transformantes. De acuerdo con lo anterior, un cultivo de células vegetales puede ser transformado, con tal constructo de transformación y, sucesivamente, las células transformadas exitosamente, pueden ser cultivadas en una planta transgénica deseada que exprese los casetes del promotor/polinucleótido que operan de manera convergente.
- 15 Los promotores pueden ser promotores constitutivos o inducibles o permutaciones de los mismos. Promotores "fuertes" por ejemplo, pueden ser los aislados a partir de virus, tales como, el virus baciliforme de tungro de arroz, el virus de mancha del maíz, el virus de vena de casava, el virus mirabilis, el caulimovirus de mancha clorótico del cacahuete, el virus mosaico del higo y el virus chlorella. Otros promotores pueden ser clonados a partir de especies bacterianas tales como los promotores del gen de nopalina sintasa y octopina sintasa. Hay diversos promotores inducibles, pero típicamente un promotor inducible puede ser un promotor sensible a la temperatura, un promotor inducido químicamente o un promotor temporal.
- 20 Específicamente, un promotor inducible puede ser un promotor Ha hasp 17.7 G<sub>4</sub>, un promotor de trigo WCS120, un promotor de gen Rab 16A, un promotor del gen de la [alfa]-amilasa, o un promotor del gen pin2, o un promotor de carboxilasa.
- La presente divulgación también describe un constructo, que comprende un casete de expresión que comprende (i) un primer promotor enlazado operativamente a un primer polinucleótido y (ii) un segundo promotor enlazado operativamente a un segundo polinucleótido, en donde (a) ni el primero ni el segundo polinucleótidos están enlazados operativamente a un terminador, (b) al menos una parte del segundo polinucleótido es sustancialmente idéntico en secuencia de nucleótidos a al menos una parte de la secuencia del primer polinucleótido pero está posicionado dentro del casete en una orientación diferente al primer polinucleótido, y (c) la dirección de transcripción iniciada a partir del primer promotor es hacia el segundo promotor y la dirección de transcripción iniciada desde el segundo promotor es hacia el primer promotor.
- 30 Al menos una parte del segundo polinucleótido puede estar orientada como una copia complementaria inversa de al menos una parte del primer polinucleótido.
- La secuencia que termina la transcripción, a la cual ningún polinucleótido esta enlazado operativamente, puede ser una secuencia en el extremo 3´ de un gen que está involucrado en la formación del extremo 3´ y la poliadenilación del transcripto de ese gen.
- 40 La secuencia que está involucrada en la formación del extremo 3 y de la poliadenilación puede ser de terminación.
- El casete de expresión puede no comprender (i) un terminador de gen nos, (ii) la secuencia de 3´ no traducida del gen 7 de T-ADN, (iii) las secuencias de 3´ no traducidas del gen de la proteína corporal de inclusión principal del virus mosaico de la coliflor, (iv) las secuencias no traducidas 3´ de la subunidad pequeña 1,5-bifosfato carboxilato de la ribulosa de guisante, (v) las secuencias no traducidas de 3´ del gen de ubiquitina-3 de patata, o (vi) las secuencias no traducidas de 3´ del gen inhibidor II de la proteinasa de patata, (vii) las secuencias no traducidas de 3´ de los genes opina, (viii) las secuencias no traducidas de 3´ de genes endógenos.
- 45 El primer polinucleótido puede comprender una secuencia que comparta identidad de secuencia con un gen objetivo o al menos uno de un elemento regulador que está asociado con el gen objetivo, un exón del gen objetivo, un intrón del gen objetivo, la región 5´ no traducida del gen objetivo, o la región 3´ no traducida del gen objetivo.
- 50 El primer polinucleótido puede comprender una secuencia que comparte aproximadamente 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60%, 59%, 58%, 57%, 56%, 55%, 54%, 53%, 52%, 51%, 50%, 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%,

10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% de identidad de secuencia de nucleótidos con una secuencia de la secuencia objetivo.

5 Un gen objetivo puede ser un gen COMT involucrado en la biosíntesis de lignina, un gen CCOMT involucrado en la biosíntesis de lignina, cualquier otro gen involucrado en la biosíntesis de lignina, un gen R1 involucrado en la fosforilación de almidón, un gen de fosforilasa involucrado en la fosforilación de almidón, un gen PPO involucrado en la oxidación de polifenoles, un gen de poligalacturonasa involucrado en la degradación de pectina, un gen involucrado en la producción de alérgenos, un gen involucrado en la biosíntesis de ácidos grasos tal como FAD2.

10 En la presente divulgación, (a) el elemento regulador del gen objetivo puede ser el promotor o un elemento potenciador asociado con el gen objetivo o (b) el primer polinucleótido puede comprender una secuencia que comparte identidad de secuencia con un intrón de un gen objetivo, en donde el intrón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 44.

El gen objetivo puede estar localizado en el genoma de una célula. Por lo tanto, la célula puede ser una célula de una bacteria, virus, hongo, levadura, planta, réptil, ave, pez o mamífero.

La secuencia objetivo puede estar localizada en una secuencia de ADN que codifica un transcrito de ARN.

El primero y segundo promotores pueden ser funcionales en una planta.

15 El casete de expresión puede estar localizado entre las secuencias de frontera del ADN de transferencia de un plásmido que es adecuado para la transformación de plantas mediada por bacterias.

La bacteria puede ser *Agrobacterium*, *Rhizobium*, o *Phyllobacterium*. La bacteria puede ser *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Phyllobacterium myrsinacearum*, *SinoRhizobium meliloti*, y *MesoRhizobium loti*.

20 El constructo puede comprender adicionalmente un polinucleótido espaciador posicionado entre el primero y segundo polinucleótidos. El polinucleótido espaciador puede tener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400, 500, o más de 500 nucleótidos de longitud.

25 El primer promotor puede ser un promotor constitutivo cercano, un promotor específico para tejidos, o un promotor inducible y en donde el segundo promotor es un promotor constitutivo cercano, un promotor específico para tejido o un promotor inducible.

30 El promotor constitutivo fuerte puede ser seleccionado del grupo que consiste del promotor de ubiquitina 7 de patata, un promotor de ubiquitina 3 de patata, un promotor de ubiquitina de tomate, un promotor de petE de alfalfa, un promotor Pal de alfalfa, un promotor de napina de canola, un promotor de ubiquitina de maíz, un promotor de ubiquitina de arroz, un promotor de ubiquitina de caña de azúcar, un promotor de actina de arroz, un promotor de la subunidad pequeña rubisco, y un promotor de la rubisco activasa.

El promotor específico de tejido puede ser un promotor de la sintasa de enlazamiento de gránulos de almidón o un promotor del gen de la ADP glucosa fosforilasa.

35 El promotor inducible puede ser un promotor sensible a la temperatura, un promotor inducido químicamente o un promotor temporal.

40 El promotor inducible es seleccionado del grupo consistente de un promotor Ha hsp 17.7 G4, un promotor WCS120 de trigo, un promotor del gen Rab 16A, un promotor del gen de  $\alpha$ -amilasa, un promotor del gen pin2 y un promotor de carboxilasa. La presente divulgación también describe un plásmido de transformación que comprende un casete de expresión el cual comprende en la orientación 5' a 3' (1) un primer promotor que está enlazado operativamente a (2) un primer polinucleótido deseado, el cual sostiene (3) al menos un polinucleótido espaciador opcional, en donde el extremo 3' de uno de los polinucleótidos espaciadores sostiene un (4) segundo polinucleótido deseado, el cual esta enlazado operativamente a (5) un segundo promotor, en donde ningún polinucleótido deseado en el casete de operación está enlazado operativamente a ningún terminador de transcripción conocido.

45 Al menos una parte del primer polinucleótido deseado puede estar en la orientación antisentido y en donde al menos una parte del segundo polinucleótido deseado puede estar orientado como el complemento inverso del primer polinucleótido deseado.

Al menos parte del primer polinucleótido deseado puede estar en la orientación en sentido y en donde al menos parte del segundo polinucleótido deseado puede estar orientado como el complemento inverso del primer polinucleótido deseado.

50 Al menos parte del primer polinucleótido deseado puede ser una secuencia promotora.

La secuencia promotora puede ser de un promotor seleccionado del grupo consistente de (1) un promotor del gen R1 asociado con almidón, (2) un promotor del gen apolifenol oxidasa, (3) un promotor del gen ácido graso desaturasa 12, (4) un promotor del gen de ácido graso omega-6 desaturasa microsómico, (5) un promotor del gen de delta 9-desaturasa de la proteína portadora de estearoil-acilo de algodón, (6) un promotor del gen de omega 6-desaturasa de oleoil-fosfatidil colina (7) un gen promotor de ácido cafeico/ácido g/5-hidroxiferúlico/5-O-metiltransferasa (COMT) de Medicago truncatula, (8) un gen promotor de ácido cafeico/ácido 5-hidroxiferúlico 3/5-O-metiltransferasa (COMT) de Medicago sativa (alfalfa), (9) un gen promotor de la cafeoil CoA 3-O-metiltransferasa (CCOMT) de Medicago truncatula, (10) un gen promotor de la cafeoil CoA 3-O-metiltransferasa (CCOMT) de Medicago sativa (alfalfa), (11) un gen promotor principal del alérgeno Mal d1 de manzana, (12) un gen promotor principal del alérgeno Ara h2 de cacahuete, (13) un gen promotor principal de Gly m Bd 30 K del alérgeno de soja y (14) un gen promotor de poligalacturonasa.

En la presente divulgación, (i) al menos uno del primero y segundo promotores pueden ser un promotor GBSS, y (ii) el primer polinucleótido deseado puede ser una secuencia de un gen de polifenol oxidasa.

El primero y segundos promotores pueden ser promotores de GBSS.

Tanto el primer promotor puede ser un promotor de GBSS y el segundo promotor puede ser un promotor de AGP.

La presente divulgación también describe un método para reducir la expresión de un gen que es normalmente capaz de ser expresado en una célula vegetal, que comprende la exposición de una célula vegetal a cualquier constructo descrito aquí, en donde el constructo es mantenido en una cepa bacteriana, en donde el polinucleótido deseado comprende una secuencia que comparte identidad de secuencia con una secuencia objetivo en el genoma de la célula vegetal.

La cepa bacteriana puede ser *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Phyllobacterium myrsinacearum*, *Sino-Rhizobium meliloti*, y *MesoRhizobium loti*.

La presente divulgación describe un constructo, que comprende un casete de expresión que comprende en la orientación 5' a 3' (i) un primer promotor, (ii) un primer polinucleótido que comprende una secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos una parte de una secuencia promotora de un gen objetivo, (iii) un segundo polinucleótido que comprende una secuencia que comparte identidad de secuencia con el complemento inverso de al menos una parte del promotor del gen objetivo, y (iv) un segundo promotor, en donde el primer promotor está enlazado operativamente al extremo 5' del primer polinucleótido y el segundo promotor está enlazado operativamente al extremo 3' del segundo polinucleótido.

La presente divulgación también describe un constructo, que comprende un casete de expresión el cual comprende en la orientación 5' a 3' (i) un primer promotor, (ii) un primer polinucleótido que comprende una secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos una parte de una secuencia del promotor de un gen objetivo, (iii) un segundo polinucleótido que comprende una secuencia que comparte identidad de secuencia con el complemento inverso de al menos una parte del promotor del gen objetivo (iv) un terminador, en donde el primer promotor está enlazado operativamente al extremo 5' del primer polinucleótido y el segundo polinucleótido está enlazado operativamente al terminador.

La presente divulgación también describe un plásmido de transformación vegetal que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 40 o 42.

La presente divulgación también describe un método para reducir endulzamiento inducido por frío en un tubérculo, que comprende expresar cualquier constructo descrito aquí en una célula de un tubérculo, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia de parte de un gen R1 (b) el segundo polinucleótido es el complemento inverso del primer polinucleótido en comparación con el primer polinucleótido, (c) ambos o uno del primero y segundo promotores son GBSS o AGP, y (d) la expresión del constructo en la célula reduce la transcripción y/o traducción de un gen R1 en el genoma de la célula del tubérculo, reduciendo por lo tanto el endulzamiento inducido por el frío en el tubérculo. El primer polinucleótido puede comprender la secuencia representada en SEQ ID NO: 23 o 24. El tubérculo puede ser una patata. El primer polinucleótido puede comprender dos copias de la secuencia de SEQ ID NO: 23 o 24.

La presente divulgación también se relaciona con un método para potenciar la tolerancia a la lesión por mancha negra en un tubérculo, que comprende la expresión de cualquier constructo descrito aquí en una célula de un tubérculo, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia de parte de un gen de polifenol oxidasa, (b) el segundo polinucleótido es el complemento inverso del primer polinucleótido, (c) uno o ambos del primero y segundo promotores son GBSS o AGP, y (d) la expresión del constructo en la célula reduce la transcripción y/o traducción de un gen de polifenol oxidasa en el genoma de la célula de tubérculo, potenciando por lo tanto la tolerancia del tubérculo a la lesión por mancha negra. En una realización, el primer polinucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 o 27. El tubérculo puede ser una patata. El primer polinucleótido puede comprender dos copias de la secuencia de SEQ ID NO: 26 o 27.

La presente divulgación también se relaciona con un método para incrementar los niveles de ácido oleico en una planta portadora de aceite, que comprende expresar cualquier constructo descrito aquí en una célula de una semilla de una



- 5 planta portadora de aceite, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia de parte de un gen Fad2, (b) el segundo polinucleótido es un complemento inverso del primer polinucleótido, (c) uno o ambos del primero y segundo promotores son el gen de napina, el gen Fad2, o promotores del gen de estearoil-ACP desaturasa, y (d) la expresión del constructo en la célula reduce la transcripción y/o traducción de un gen Fad2 en la célula de la semilla de la planta portadora de aceite, incrementando por lo tanto el contenido de aceite de la semilla. El primer polinucleótido puede comprender la secuencia representada en SEQ ID NO: 28. La secuencia del promotor del gen napina puede comprender la secuencia representada en SEQ ID NO: 30.
- 10 La secuencia del promotor del gen de estearoil-ACP desaturasa puede comprender la secuencia representada en SEQ ID NO: 31.
- 10 La secuencia del promotor de gen Fad2 puede comprender la secuencia representada en SEQ ID NO: 32.
- La planta portadora de aceite puede ser una planta de *Brassica*, planta de canola, planta de soja, planta de algodón o planta de girasol.
- 15 La presente divulgación también describe un método para reducir el contenido de lignina en una planta, que comprende expresar cualquier constructo descrito aquí en una célula de la planta, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia de parte de un gen de ácido cafeico/ácido 5-hidroxiferúlico 3/5-O-metiltransferasa (COMT), (b) el segundo polinucleótido es el complemento inverso del primer polinucleótido, (c) uno o ambos del primero y segundo promotores son los promotores de gen petE o pal y (d) la expresión del constructo en la célula reduce la transcripción y/o traducción de un gen COMT en la célula de la planta, reduciendo por lo tanto el contenido de lignina en una planta. La célula puede estar presente en el sistema vascular de la planta. En una realización preferida, la planta es una planta de alfalfa. El primer polinucleótido puede comprender la secuencia representada en SEQ ID NO: 33 o 37.
- 20 La presente divulgación describe un método para reducir la degradación de la pectina en una fruta de una planta, comprendiendo la expresión de cualquier constructo descrito aquí en una célula de fruta de la planta, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia de parte de un gen de poligalacturonasa, (b) el segundo polinucleótido es el complemento inverso del primer polinucleótido, (c) tanto el primero como el segundo promotores son promotores específicos de la fruta, y (d) la expresión del constructo en la célula de la fruta reduce la transcripción y/o traducción de un gen de poligalacturonasa en la célula de la planta, reduciendo por lo tanto la degradación de la pectina en la fruta. El primer polinucleótido puede comprender la secuencia representada en SEQ ID NO: 39.
- 25 La presente divulgación describe un método para reducir la alergenicidad de un alimento producida por una planta, que comprende la expresión de cualquier constructo descrito aquí en una célula de una planta, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia de parte de un gen que codifica un alérgeno, (b) el segundo polinucleótido es el complemento inverso del primer polinucleótido, y (c) la expresión del constructo reduce la transcripción y/o traducción del alérgeno, reduciendo por lo tanto la alergenicidad de un alimento producido por la planta.
- 30 En la presente divulgación, (a) la planta puede ser una planta de manzana, (b) el alimento puede ser una manzana, (c) el primer polinucleótido puede comprender una secuencia del promotor de gen Mal d I, y (d) la expresión del constructo en la planta de manzana puede reducir la transcripción y/o traducción de Mal d I en la manzana.
- 35 En la presente divulgación, (a) planta puede ser una planta de cacahuete, (b) el alimento puede ser un cacahuete, (c) el primer polinucleótido puede comprender una secuencia del promotor del gen Ara h2, y (d) la expresión del constructo en la planta de cacahuete reduce la transcripción y/o traducción de Ara h2 en el cacahuete.
- 40 En la presente divulgación, (a) la planta puede ser una planta de soja, (b) el producto puede ser una soja, (c) el primer polinucleótido puede comprender una secuencia del promotor de gen Gly m Bd, y (d) la expresión del constructo en la planta de soja puede reducir la transcripción y/o traducción de Gly m Bd en la soja.
- 45 La presente divulgación describe un método para subregular la expresión de genes múltiples en una planta, que comprende expresar en una célula de una planta un constructo que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 40, la cual subregula la expresión de la polifenol oxidasa, el gen de la fosforilasa L y el gen de R1 en la célula de vegetal.
- La presente divulgación describe un método para subregular la expresión de genes múltiples en una planta que comprende expresar en una célula de una planta un constructo que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 42, la cual subregula la expresión de polifenol oxidasa, gen de fosforilasa L y el gen R1 en la célula vegetal.
- 50 La presente divulgación describe un constructo, que comprende un promotor deseado que está enlazado operativamente a (i) un primer promotor en su extremo 5' (ii) un segundo promotor en su extremo 3', en donde el promotor deseado comparte identidad de secuencia con un promotor objetivo en un genoma de interés.
- La presente divulgación describe un constructo, que comprende dos copias orientadas de manera convergente de un promotor deseado que están separadas por un polinucleótido, en donde el promotor deseado comparte identidad de

secuencia con un promotor objetivo en un genoma deseado de interés. El polinucleótido que separa los promotores orientados de manera convergente puede ser un intrón.

5 La presente divulgación se relaciona con un constructo, que comprende dos promotores deseados que están enlazados operativamente a un promotor y un terminador, en donde los promotores deseados comparten identidad de secuencia con un promotor objetivo en un genoma de interés. Los dos promotores deseados pueden compartir, a lo largo de al menos una parte de sus longitudes respectivas, identidad de secuencia uno con otro y en donde uno de los promotores deseados puede estar orientado como el complemento inverso del otro.

10 La presente divulgación se relaciona con un constructo, que comprende dos promotores deseados que están enlazados operativamente a un promotor y un terminador, en donde los promotores deseados comparten identidad de secuencia con un promotor objetivo en un genoma de interés. Los dos promotores deseados pueden compartir, a lo largo de al menos una parte de sus longitudes respectivas, identidad de secuencia uno con otro y en donde uno de los promotores deseados puede estar orientado como el complemento inverso del otro.

15 La divulgación de productos se relaciona con un constructo que comprende cuatro repeticiones directas de un polinucleótido de interés, las cuales son precedidas por un fragmento de ADN antisentido del polinucleótido de interés. Tal constructo está representado por pSIM1111.

20 La presente divulgación también provee un método para reducir el nivel de expresión de un gen endógeno en una planta de alfalfa, que comprende introducir un casete en una célula de alfalfa, en donde el casete comprende dos promotores específicos de alfalfa dispuestos en una orientación convergente uno a otro, en donde la actividad de los promotores en el casete reduce el nivel de expresión de un gen de alfalfa endógeno, el cual está enlazado operativamente en el genoma de la alfalfa a un promotor que tiene una secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos una parte de uno de los promotores en el casete. La secuencia de al menos uno de los promotores está representada en SEQ ID NO: 54 o SEQ ID NO: 55.

25 La presente divulgación también provee un método para reducir la expresión de un gen Comt, que comprende expresar un fragmento de un gen Comt o un fragmento de un promotor de Comt en una célula que comprende un gen Comt en su genoma.

La presente divulgación también provee un método para reducir la expresión de un gen de Comt o un gen Ccomt, que comprende expresar el constructo de cualquier constructo descrito aquí en una célula que comprende un gen Comt o un gen Ccomt en su genoma, en donde el primer polinucleótido comprende una secuencia de un gen Comt o un promotor de gen Comt o un gen Ccomt o un promotor de gen Ccomt.

30 Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 representa diagramas específicos para T-ADN de vectores binarios que (a) representan un control negativo (pSIM714) y (b) comprende constructos que representan constructos de silenciamiento convencionales, pSIM374, pSIM718 y pSIM755. "B" denota una secuencia frontera de ADN de transferencia; "T" denota una secuencia de terminación; "hptII" es un gen de resistencia que confiere resistencia a la higromicina a una planta; "P1" denota una secuencia promotora y, en este ejemplo, es un promotor que es idéntico al promotor que guía un gen de beta-glucuronidasa activo funcionalmente (gus) en la planta gus transgénica; "P2" denota una secuencia promotora que también es funcionalmente activa pero diferente de P1; "gus-S" denota un fragmento de un gen gus; "gus-A" denota un complemento inverso del fragmento del gen de gus; "I" denota un intrón. Con respecto a gus-S y gus-A la flecha gruesa sólida significa (parte de los) transcritos de ARN que comparten identidad con una parte del transcripto producido por la expresión del gen gus; las flechas gruesas punteadas significan (parte de) los transcritos de ARN que comparten identidad con una parte del complemento inverso del transcripto del gen gus; las líneas regadas significan partes del transcripto con homología o complementariedad inversa a otra secuencia tal como el intrón del constructo. En este aspecto, la flecha abierta que apunta hacia la izquierda (la cual denota el elemento "gus-A" en el casete) indica que el elemento gus-A está orientado en el casete de expresión como el complemento inverso del gus-S, la flecha que señala hacia la derecha. Por lo tanto, los promotores P1 y P2 están orientados de tal manera que la transcripción desde cada uno procede de una manera convergente, esto es, la transcripción de P1 proceda hacia P2 y viceversa.

40 La figura 2 representa diagramas esquemáticos para T-ADN de vectores binarios que comprenden constructos que recuerdan los constructos de silenciamiento convencionales excepto en que carecen de un terminador, pSIM728, pSIM140 y pSTM758. Con respecto a gus-S y gus-A, la flecha gruesa sólida significa la parte de los transcritos de ARN que comparten identidad con una parte del transcripto producido por la expresión del gen gus; la flecha punteada gruesa significa parte de los transcritos de ARN que comparten identidad con una parte del complemento inverso del transcripto del gen gus; las líneas delgadas significan partes del transcripto con homología o complementariedad inversa a otra secuencia tal como el intrón del constructo.

55 La figura 3 representa diagramas esquemáticos para T-ADN que comprende constructos "de transcripción colisionante libre de terminador" (TFCT). Específicamente, ilustra los T-ADN de pSIM715, pSIM717, pSIM756 y pSIM771. La clave para los elementos identificados y las flechas sólidas y punteadas es la misma que la explicada en la descripción de la

- 5 figura 1. En pSIM717, la lectura de la transcripción originada tanto desde P1 como P2 sobre el intrón produce transcritos que contienen secuencias 5' idénticas a la parte del transcripto del gen gus y secuencias 3' que son inversas complementarias al transcripto del gen gus. Estos transcritos pueden plegarse para producir parcialmente ARN de doble cadena. Dependiendo de la capacidad del complejo de transcripción P1 para proceder cargado, un transcripto de ARN, iniciado desde el promotor P1, podría transcribir predeciblemente secuencias corriente abajo de la secuencia de gus-S a la cual está enlazado operativamente. De acuerdo con lo anterior, cuando se lee el "tope", esto es, la cadena en sentido de pSIM717, en una dirección 5' a 3', un transcripto de P1 puede comprender la secuencia del intrón que interviene ("I"), así como la secuencia del elemento gus-S de complemento inverso. La secuencia de la cadena "tope" del elemento gus-S de complemento inverso es el antisentido de gus-S.
- 10 La figura 4 representa diagramas esquemáticos para T-ADN que comprenden constructos de "transcripción colisionante libre de terminador" (TFCT). Específicamente, ilustra a los T-ADN de pSIM754, pSIM773 y pSIM767. La clave para los elementos identificados y las flechas sólidas y punteadas es la misma que la explicada para la descripción de la figura 1. P1n indica la parte del promotor p1 que está corriente arriba de la caja TATA. Esta secuencia no es funcional como promotora.
- 15 La figura 5 representa diagramas específicos para T-ADN que comprende constructos de "transcripción colisionante libre de terminador" (TFCT). Específicamente, ilustra el T-ADN de pSIM782. La clave para los elementos identificados y las flechas sólidas y punteadas es la misma que la explicada en la descripción de la figura 1. GusI indica el intrón del gen de gus.
- 20 La figura 6 representa diagramas esquemáticos para T-ADN que comprende constructos de "transcripción colisionante libre de terminador" (TFCT). Específicamente, ilustra los T-ADN de pSIM765, pSIM922F, pSIM922G, pSIM774 y pSIM775. La clave para los elementos identificados y las flechas sólidas y punteadas es la misma que la explicada en la descripción de la figura 1. PPO indica un fragmento del gen PPO del tabaco.
- 25 La figura 7 muestra geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio que contiene los productos de RT-PCR + = control de plásmido positivo; - = control negativo; M = marcador; T1 = transcripto del promotor P1; T2 = transcripto del promotor P2.
- La figura 8 muestra autorradiogramas de siembras en gel de ARN. La sonda utilizada para la hibridación fue derivada del gen gus.
- La figura 9 muestra un análisis de secuencia de los diversos fragmentos promotores e identifica una secuencia de 89-bp que puede ser ventilada durante el silenciamiento basado en el promotor.
- 30 La figura 10 representa mapas de plásmido. G: fragmento de gen gus; H: casete de expresión para el gen hptII; LB: región de frontera izquierda; RB: región de frontera derecha; T: terminador; P1: promotor P1; P1n: promotor P1 no funcional que carece de una caja TATA; P2: promotor P2; P3: promotor P3; GB: promotor GBSS; PP: fragmento del gen PPO; PT = fragmento del gen PPO de tabaco. La dirección de la transcripción está indicada con una flecha sólida negra pequeña.
- 35 Descripciones detalladas de las realizaciones preferidas
- Un constructo de la presente realización puede ser utilizado para reducir o prevenir eficientemente la transcripción o traducción de un ácido nucleico objetivo disparando la transcripción convergente de un polinucleótido deseado. Por lo tanto una meta de la presente invención es proveer constructos que produzcan moléculas de ácido nucleico que previenen o reducen la expresión de un gen o de un producto genético, tal como un transcripto de ARN o proteína.
- 40 Una característica particular de tal constructo es que, en contraste con los constructos de silenciamiento convencionales, no se inserta un terminador funcional y operativamente enlazado al extremo 3' de un polinucleótido deseado. Está bien establecido que un terminador es una secuencia de nucleótido, típicamente localizada en el extremo 3' de un gen, que está involucrada en la escisión del transcripto de ARN que es transcripto desde el gen y en la poliadenilación de ese transcripto. Típicamente, un terminador está localizado corriente abajo del codón de detención del gen.
- 45 Los terminadores que fueron utilizados para la construcción de casetes de silenciamiento convencionales, y que están excluidos de los constructos de la presente invención, fueron derivados a partir de tales regiones 3' de ciertos genes y frecuentemente también incluían incluso más secuencias de ADN no transcritas corriente abajo. La selección de cuál terminador usar ha sido más frecuentemente simplemente un asunto de conveniencia. Por lo tanto, los terminadores de opina o las regiones de terminación de genes endógenos y caracterizados previamente han sido utilizados en constructos de silenciamiento convencionales. Uno de los terminadores usados más frecuentemente, por ejemplo, es el terminador del gen de nopalina sintasa (nos) de Agrobacterium, el cual comprende tres secuencias no traducidas 3' y algo de ADN adicional corriente abajo. Otros terminadores incluyen:
- 50 Las secuencias de 3' no traducidas del gen 7 de T-ADN (Genbank accession V00090).

Las secuencias de 3' no traducidas del gen de la proteína de inclusión de cuerpo principal del virus mosaico de la coliflor.

Las secuencias no traducidas de 3' de la subunidad pequeña de 1,5-bifosfato carboxilasa de la ribulosa de guisante (Genbank accession M21375).

5 Las secuencias no traducidas de 3' del gen de ubiquitina-3 de patata (Genbank accession Z11669).

Las secuencias no traducidas de 3' del gen inhibidor de proteinasa II de patata (Genbank accession CQ889094).

Las secuencias no traducidas de 3' de genes de opina.

Las secuencias no traducidas de 3' de genes endógenos; esto es genes que normalmente son expresados por el genoma de un organismo.

10 Con respecto a la presente divulgación, sin embargo, ninguno de tales terminadores, en efecto, ningún terminador funcional, está enlazado operativamente de manera directa a un polinucleótido deseado del presente constructo. Ni está un polinucleótido deseado enlazado operativamente de manera directa a un terminador que es precedido por una secuencia codificadora de ribozima autodivisible.

15 Otra característica del constructo de la presente divulgación es que promueve la transcripción convergente de una o más copias del polinucleótido que está o no enlazado operativamente de manera directa a un terminador, a través de dos promotores opuestos. Debido a la ausencia de una señal de terminación, la longitud del conjunto de las moléculas de ARN que es transcrito a partir del primero y segundo promotores puede ser de diversas longitudes.

20 Ocasionalmente, por ejemplo, la maquinaria de transcripción puede continuar transcribiendo después del último nucleótido que significa el "final" de la secuencia de polinucleótido deseada. De acuerdo con esto, en esta disposición particular, la terminación de la transcripción puede ocurrir bien sea a través de la acción débil y no prevista de las secuencias corriente abajo que, por ejemplo, promueven la formación de horquilla o a través de la acción de terminadores transcripcionales no previstos localizados en el ADN de planta que flanquea el sitio de integración del ADN de transferencia.

25 Un constructo de transcripción de colisionamiento libre de terminador (TFCT) de la presente divulgación, por lo tanto, puede comprender un primer promotor enlazado operativamente a un primer polinucleótido y un segundo promotor enlazado operativamente a un segundo polinucleótido, con lo cual (1) el primero y segundo polinucleótidos comparten al menos alguna identidad de secuencia uno con otro y una secuencia objetivo, y (2) el primer promotor está orientado de tal manera que la dirección de la transcripción iniciada por este promotor procede hacia el segundo promotor, y viceversa, (3) el constructo produce moléculas de ARN que son en general diferentes en tamaño, representando algunos transcritos las contrapartes de ARN de al menos una parte del polinucleótido y comprendiendo otras las contrapartes al menos alguno de los dos polinucleótidos y su complemento inverso.

30 El polinucleótido deseado puede estar enlazado en dos orientaciones diferentes al promotor. En una orientación, por ejemplo, "en sentido", al menos la parte 5' del transcripto de ARN resultante compartirá identidad de secuencia con al menos una parte de al menos un transcripto objetivo. Un ejemplo de esta disposición es mostrada en la Figura 3 como pSIM717. En la otra orientación diseñada como "antisentido", al menos la parte 5' del transcripto predicho será idéntica u homóloga a la al menos parte del complemento inverso de al menos un transcripto objetivo. Un ejemplo de esta última disposición se muestra en la Figura 3 como pSIM756.

35 Tal como se utiliza aquí, "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos incluye referencia a los residuos en las dos secuencias que son la misma cuando se alinean para correspondencia máxima a lo largo de una región especificada. Cuando el porcentaje de identidad de secuencia se utiliza de referencia a proteínas se reconoce que las posiciones de los residuos que no son idénticas difieren frecuentemente por sustituciones de aminoácidos conservadoras, en donde los residuos de aminoácidos están sustituidos por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (por ejemplo carga o hidrofobicidad) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, la presente identidad de secuencia puede ser ajustada hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren en tales sustituciones conservadoras tienen "similitud de secuencias" o "similitud". Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos para los experimentados en el arte. Típicamente esto involucra calificar una sustitución conservadora como parcial en vez de una no coincidencia completa, incrementando por tanto el porcentaje de identidad de secuencia. Así, por ejemplo, cuando a un aminoácido idéntico se da un marcador de 1 y a una sustitución no conservadora se da un marcador de cero, se da a una sustitución conservadora un marcador entre cero y 1. El marcador de las sustituciones conservadoras es calculado, por ejemplo, de acuerdo con el algoritmo de Meyers y Miller, Computer Applic. (Intelligenetics, Mountain View, California, Estados Unidos).

Tal como se utiliza aquí, "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones "esto es, brechas" en comparación con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones o eliminaciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje es calculado determinando el número de posiciones en las cuales el residuo de bases de ácido nucleico o aminoácidos idénticos se presentan ambas secuencias para generar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de las secuencias por comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Match.* 2: 482 (1981); mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970); mediante la búsqueda de método de similaridad de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 2444 (1988); por la implementación por ordenador de estos algoritmos, incluyendo, pero no limitándose a: CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, California; GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, Estados Unidos; el programa CLUSTAL está bien descrito en Higgins and Sharp, *Gene* 73: 237-244 (1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5: 151-153 (1989); Corpet, et al., *Nucleic Acids Research* 16: 10881-90 (1988); Huang, et al., *Computer Applications in the Biosciences* 8: 155-65 (1992), y Pearson, et al., *Methods in Molecular Biology* 24: 307-331 (1994).

La familia BLAST de programas que pueden ser utilizados para búsquedas de similitud en bases de datos incluyen: BLASTN para la búsqueda de secuencias de nucleótidos contra secuencias de bases de datos de nucleótidos; BLASTX para búsqueda de secuencias de nucleótidos contra secuencias de bases de datos de proteínas; BLASTP para búsquedas de secuencias de proteína contra secuencias de bases de datos de proteínas; TBLASTN para búsquedas de secuencias de proteínas contra secuencias de bases de datos de nucleótidos; y TBLASTX para búsqueda de secuencias de nucleótidos contra secuencias de bases de datos de nucleótidos. Véase, *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 19, Ausubel, et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995); Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990); y, Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:33 89-3402 (1997).

El software para llevar cabo análisis BLAST está disponible de manera pública, por ejemplo, a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo involucra primero identificar pares de secuencias de alto marcador (HSP) identificando palabras cortas de longitud  $W$  en la secuencia buscada, la cual bien sea coincide o satisface con algún marcador de umbral de valor positivo  $T$  cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos.  $T$  se considera como el umbral de marcador de la palabra vecina. Estos impactos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar los HSP más largos que las contienen. Los impactos de palabra se extienden entonces en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en que el marcador de alineamiento acumulativo puede ser incrementado. Los marcadores acumulativos se calculan utilizando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros  $M$  (marcador de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre  $> 0$ ) y  $N$  (marcador de penalidad para residuos no coincidentes; siempre  $< 0$ ). Para secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de marcación para calcular el marcador acumulativo. La extensión de los impactos de palabra en cada dirección se detiene cuando: el marcador de alineamiento acumulativo cae por fuera de la cantidad  $X$  a partir de su valor máximo alcanzado; el marcador acumulativo llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de marcador negativo; o se alcanza el extremo de cada secuencia. Los parámetros  $W$ ,  $T$  y  $X$  del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótido) utiliza como valor de fondo una longitud de palabra ( $W$ ) de 11, una expectativa ( $E$ ) de 10, un corte de 100,  $M=5$ ,  $N=-4$  y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valor de fondo una longitud de palabra ( $W$ ) de 3, una expectativa ( $E$ ) de 10, y la matriz de marcación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci., Estados Unidos* 89:10915).

Además del cálculo del porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadísticos de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci., Estados Unidos* 90:5873-5877 (1993)). Una medida de similitud provista por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ( $P(N)$ ), la cual provee una indicación de la probabilidad con la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad.

Las búsquedas BLAST asumen que las proteínas pueden ser modeladas como secuencias aleatorias. Sin embargo, muchas proteínas reales comprenden regiones de secuencias no aleatorias las cuales pueden ser trectos homopoliméricos, repeticiones de periodo corto, o regiones enriquecidas en uno o más aminoácidos. Tales regiones de baja complejidad pueden ser alineadas entre proteínas no relacionadas incluso aunque otras regiones de la proteína sean completamente disímiles. Un cierto número de programas de filtro de baja complejidad pueden ser empleados para reducir tales alineamientos de baja complejidad. Por ejemplo, los filtros de baja complejidad SEG (Wooten y Federhen, *Comput. Chem.*, 17:149-163 (1993)) y XNU (Claverie y States, *Comput. Chem.*, 17:191-201 (1993)) pueden ser empleados solos o en combinación.

El alineamiento múltiple de las secuencias puede llevarse a cabo utilizando el método CLUSTAL de alineamiento (Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151:153) con los parámetros de fondo (PENALIDAD DE BRECHA=10, PENALIDAD DE LONGITUD DE BRECHA =10). Los parámetros de fondo para alineamientos apareados utilizando el método CLUSTAL son KTUPLE 1, PENALIDAD DE BRECHA=3, VENTANA=5, y DIAGONALES GUARDADAS=5.

5 Cualquiera o todos los elementos de las secuencias de ADN que se describen aquí pueden ser endógenos para uno o más genomas de plantas. De acuerdo con lo anterior, todos los elementos y secuencias de ADN, que son seleccionados para el casete de transferencia final pueden ser endógenos para, o nativos para, el genoma de la planta que va a ser transformado. Por ejemplo, todas las secuencias pueden venir de un genoma de patata. Alternativamente, uno o más de los elementos o secuencias de ADN pueden ser endógenos a un genoma de planta que no es la misma que la especie de la planta que va a ser transformada, pero que funciona en cualquier evento en la célula de la planta anfitriona. Tales plantas incluyen plantas de patata, tomate y alfalfa. La presente divulgación también abarca el uso de uno o más elementos genéticos de una planta que es infértil con la planta que va a ser transformada.

15 Las preocupaciones públicas fueron abordadas a través del desarrollo de una metodología completamente natural para hacer plantas manipuladas genéticamente, como se divulga en Rommens et al., en WO2003/063980, US-2003-0221213, US-2004-010745, y WO2005/004585. Rommens et al., enseña la identificación y aislamiento de elementos genéticos de plantas que pueden ser utilizados para la transformación de plantas mediada por bacterias. Así, Rommens enseña que un ADN de transferencia derivado de una planta ("P-ADN"), por ejemplo, puede ser aislado a partir de un genoma de planta y utilizado en lugar de un T-ADN de Agrobacterium para manipular genéticamente plantas.

20 En este aspecto, una "planta" incluye, pero no está limitada a angiospermas y gimnospermas tales como patata, tomate, tabaco, aguacate, alfalfa, lechuga, zanahoria, fresa, remolacha de azúcar, casava, patata dulce, soja, guisante, alubia, cocombro, uva, brassica, maíz, pasto para césped, trigo, arroz, cebada, sorgo, avena, roble, eucalipto, nogal y palma. Así, una planta puede ser una monocotiledónea o una dicotiledónea. "Planta" y "material vegetal", también abarca células de plantas, semillas, progenie de una planta, propágulo bien sea generado sexual o asexualmente, y descendientes de cualquiera de estos, tales como cortes o semillas. "Material vegetal" puede referirse a células vegetales, cultivos de suspensión de células, callus, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callus, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen, semillas, semillas en germinación y microsporas. Las plantas pueden estar en diversas etapas de madurez y pueden ser cultivadas en cultivo líquido o sólido, o en suelo o en medios adecuados en macetas, invernaderos o campos. La expresión de secuencias de guía, de arrastre o genéticas introducidas en las plantas puede ser transiente o permanente.

30 Así, cualquiera de tales plantas o materiales vegetales pueden ser transformados. En este aspecto, la transformación de una planta es un proceso mediante el cual el ADN es integrado de manera estable en el genoma de una célula vegetal. "De manera estable" se refiere a la retención y/o expresión permanente, o no transiente de un polinucleótido en y por un genoma de célula. Así, un polinucleótido integrado de manera estable es aquel que es una fijación dentro de un genoma de célula transformada y puede ser replicado y propagado a través de la progenie sucesiva de la célula o de la planta transformada resultante. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales utilizando diversos métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bernard R. Glick and John E. Thompson (eds), CRC Press, Inc., London (1993); Chilton, Scientific American, 248 (6), pp. 36-45, 1983; Bevan, Nucl. Acids. Res., 12, pp. 8711-8721, 1984; y Van Montague et al., Proc R Soc Lond B Biol Sci., 210(1180), pp. 351-65, 1980. Las plantas también pueden ser transformadas utilizando técnicas de "transformación refinada" y "cruces precisos". Véase, por ejemplo, Rommens et al., en WO2003/069980, US-2003-0221213, US-2004-010745, WO2005/004585, US-2004-0003434, US-2005-0034188, WO2005/002394, y WO2003/079765.

45 Una o más características de una planta portadora de tubérculos puede ser modificado utilizando las secuencias y elementos de transformación descritos aquí. Un "tubérculo" es un órgano de almacenamiento de alimento engrosado, usualmente subterráneo que carece de una placa basal y de un cubrimiento similar a túnica, los cuales tienen los bulbos. Las raíces y los brotes crecen desde las yemas de crecimiento, denominadas "ojos" sobre la superficie del tubérculo. Algunos tubérculos, tales como los caladiums, disminuyen en tamaño a medida que la planta crece, y forman unos tubérculos en los ojos. Otros tales como las begonias tuberosas, se incrementan en tamaño a medida que almacenan nutrientes durante la estación de crecimiento y desarrollan nuevas yemas de crecimiento al mismo tiempo.

50 Los tubérculos pueden ser apergaminados y duros o ligeramente carnosos. Pueden ser redondos, planos, de forma irregular o burdos. Ejemplos de tubérculos incluyen, pero no se limitan a ahípa, apio, arracacha, saeta de agua, raíz de saeta, baddo, casava amarga, raíz de saeta brasileña, casava, alcachofa china, castaña de agua china, coco, cocoyam, taro, eddo, oreja de elefante, girasol, goo, alcachofa Japonesa, patata Japonesa, alcachofa de Jerusalén, jícama, raíz de lirio, ling gaw, mandioca, ñame, patata Mejicana, ñame Mejicano, cocoyam viejo, patata, saa got, satooimo, seegoo, alcachofa de Jerusalén, raíz de sol, casava dulce, patatas dulces, tanier, orja de elefante, tannier, raíz de tapioca, topinambour, raíz de lirio de agua, semilla de ñame, ñame, y yautia. Ejemplos de patatas incluyen, pero no se limitan a patatas Russet, patatas blancas redondas, patatas blancas largas, patatas rojas redondas, patatas carnosas amarillas y patatas azules y púrpura.

60 Los tubérculos pueden ser clasificados como "microtubérculos", "minitubérculos", tubérculos "casi maduro" y tubérculos "maduros". Los microtubérculos y tubérculos se cultivan sobre medios de cultivo de tejidos y son pequeños en tamaño.

Por “pequeños” se entiende aproximadamente 0.1 cm–1 cm. Un “minitubérculo” es un tubérculo que es más grande que un microtubérculo y se cultiva en suelo. Un tubérculo “casi maduro” es derivado de una planta que comienza a senescer, y tiene aproximadamente 9 semanas de edad si se cultiva en un invernadero. Un tubérculo “maduro” es uno que es derivado de una planta que ha sufrido senescencia. Un tubérculo maduro es, por ejemplo, un tubérculo que tiene aproximadamente 12 o más semanas de edad.

En este aspecto, una secuencia de frontera de un ADN de transferencia derivado de una planta (“P-ADN”) de la presente divulgación no es idéntica en secuencia de nucleótidos a una secuencia de frontera de T-ADN derivado de bacterias conocido, pero funciona esencialmente para el mismo propósito. Esto es, el P-ADN puede ser utilizado para transferir e integrar un polinucleótido en otro. Un P-ADN puede ser insertado en un plásmido que induce tumor, tal como un plásmido Ti de *Agrobacterium* en lugar de un T-ADN convencional y puede mantenerse en una cepa de bacteria, tal como los plásmidos de transformación convencionales el P-ADN puede ser manipulado de tal manera que contenga un polinucleótido deseado, el cual está destinado a integrarse en un genoma vegetal a través de transformación de una planta mediada por bacteria. Véase Rommens et al., en WO2003/069980, US-2003-0221213, US-2004-0107455 y WO2005/004585.

Así, una secuencia de frontera de P-ADN es diferente en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, o más nucleótidos a partir de una secuencia de frontera de T-ADN conocida de una especie de *Agrobacterium*, tal como *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*.

Una secuencia de frontera de P-ADN no es mayor de 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60%, 59%, 58%, 57%, 56%, 55%, 54%, 53%, 52%, 51% o 50% similar en secuencia de nucleótidos a una secuencia de frontera de T-ADN de *Agrobacterium*.

Se desarrollaron métodos para identificar y aislar ADN de transferencia de plantas, particularmente de patata y trigo, y se ha hecho uso del consenso de motivos de frontera descritos en US-2004-0107455.

En este aspecto, un ADN derivado de una planta de la presente divulgación, tal como cualquiera de las secuencias, a sitios de escisión, regiones, o elementos divulgados aquí es funcional si promueve la transferencia e integración de un polinucleótido al cual está enlazado en otra molécula de ácido nucleico, tal como en un cromosoma de una planta, a una frecuencia de transformación de aproximadamente 99%, aproximadamente 98%, aproximadamente 97%, aproximadamente 96%, aproximadamente 95%, aproximadamente 94%, aproximadamente 93%, aproximadamente 92%, aproximadamente 91%, aproximadamente 90%, aproximadamente 89%, aproximadamente 88%, aproximadamente 87%, aproximadamente 86%, aproximadamente 85%, aproximadamente 84%, aproximadamente 83%, aproximadamente 82%, aproximadamente 81%, aproximadamente 80%, aproximadamente 79%, aproximadamente 78%, aproximadamente 77%, aproximadamente 76%, aproximadamente 75%, aproximadamente 74%, aproximadamente 73%, aproximadamente 72%, aproximadamente 71%, aproximadamente 70%, aproximadamente 69%, aproximadamente 68%, aproximadamente 67%, aproximadamente 66%, aproximadamente 65%, aproximadamente 64%, aproximadamente 63%, aproximadamente 62%, aproximadamente 61%, aproximadamente 60%, aproximadamente 59%, aproximadamente 58%, aproximadamente 57%, aproximadamente 56%, aproximadamente 55%, aproximadamente 54%, aproximadamente 53%, aproximadamente 52%, aproximadamente 51%, aproximadamente 50%, aproximadamente 49%, aproximadamente 48%, aproximadamente 47%, aproximadamente 46%, aproximadamente 45%, aproximadamente 44%, aproximadamente 43%, aproximadamente 42%, aproximadamente 41%, aproximadamente 40%, aproximadamente 39%, aproximadamente 38%, aproximadamente 37%, aproximadamente 36%, aproximadamente 35%, aproximadamente 34%, aproximadamente 33%, aproximadamente 32%, aproximadamente 31%, aproximadamente 30%, aproximadamente 29%, aproximadamente 28%, aproximadamente 27%, aproximadamente 26%, aproximadamente 25%, aproximadamente 24%, aproximadamente 23%, aproximadamente 22%, aproximadamente 21%, aproximadamente 20%, aproximadamente 15%, o aproximadamente 5% o al menos aproximadamente 1%.

Cualquiera de tales secuencias y elementos relacionados con la transformación pueden ser modificados o mutados para cambiar la eficiencia de la transformación. Pueden agregarse otras secuencias de polinucleótidos a una secuencia de transformación de la presente divulgación. Por ejemplo, pueden modificarse para poseer sitios de clonación múltiples 5' y 3', o sitios de restricción adicionales. La secuencia de un sitio de escisión tal como se divulga aquí, por ejemplo, puede ser modificada para incrementar la probabilidad de que el ADN del esqueleto del vector acompañante no esté integrado en un genoma vegetal.

Cualquier polinucleótido deseado puede ser insertado entre cualquier secuencia de escisión o frontera descrita aquí. Por ejemplo, un polinucleótido deseado puede ser un gen tipo silvestre o modificado que es natural a una especie de planta, o puede ser un gen de un genoma no vegetal. Por ejemplo, cuando se transforma una planta de patata, puede hacerse un casete de expresión que comprende un promotor específico para la patata que esta enlazado operativamente a un gen de patata deseado o a un fragmento del mismo y a un terminador específico de la patata. El casete de expresión puede contener elementos genéticos de patata adicionales tales como una secuencia de péptidos de señalización fusionada en el marco en el extremo 5' del gen, y un potenciador transcripcional de la patata. La presente divulgación no está limitada a tal disposición y puede construirse un casete de transformación de tal manera que el polinucleótido

deseado, mientras que está enlazado operativamente a un promotor, no está enlazado operativamente a una secuencia de terminación.

Además de los elementos derivados de la planta, tales elementos también pueden ser identificados, por ejemplo, en hongos y mamíferos. Véase, por ejemplo, SEQ ID NOs: 173-182. Varias de estas especies han demostrado ser accesibles a la transformación mediada por *Agrobacterium*. Véase Kunik et al., *Proc Natl. Acad Sci USA* 98: 1871-1876, 2001, y Casas-Flores et al., *Methods Mol Biol* 267: 315-325, 2004.

Cuando se identifica y aísla una secuencia o elemento relacionados con la transformación, tales como los descritos aquí, a partir de una planta, y si esta secuencia o elemento son usados subsecuentemente para transformar una planta de la misma especie, esa secuencia o elemento pueden ser descritos como "nativos" para el genoma vegetal.

Así un elemento genético "nativo" se refiere a un ácido nucleico que existe por naturaleza en, se origina a partir de, o pertenece al genoma de una planta y que va a ser transformado. En la misma línea, el término "endógeno" también puede ser utilizado para identificar un ácido nucleico particular, por ejemplo, ADN o ARN, o una proteína como "nativo" para una planta. Endógeno significa un elemento que se origina dentro del organismo. Así, cualquier ácido nucleico, gen, polinucleótido, molécula de ADN, ARN, ARNm o ADNc que es aislada bien sea a partir del genoma de una planta o de una especie de planta que va a ser transformado o es aislado a partir de una planta o especie que es sexualmente compatible o infértil con la especie de planta que va a ser transformada, es "nativo", para, esto es indígena, para la especie de planta. En otras palabras, un elemento genético nativo represente todo el material genético que es accesible a los cultivadores de plantas para el mejoramiento de plantas a través de cruce de plantas clásico. Cualquier variable de ácido nucleico nativo también se considera como "nativa" de acuerdo con la presente divulgación. En este aspecto, un ácido nucleico "nativo" también puede ser aislado a partir de una planta o de especies sexualmente compatibles de la misma y modificado o mutado de tal manera que la variante resultante tiene mayor que o igual a 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, o 60% similar en secuencia de nucleótidos al ácido nucleico nativo no modificado aislado de una planta. Una variante de ácido nucleico nativo puede también tener menos de aproximadamente 60%, menos de aproximadamente 55%, o menos de aproximadamente 50% de similitud en la secuencia de nucleótidos.

Un ácido nucleico "nativo" se aísla a partir de una planta también puede codificar una variante del producto proteínico de origen natural transcrito y traducido a partir de ese ácido nucleico. Así, un ácido nucleico nativo puede codificar una proteína que es mayor que o igual a 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60% similar en secuencia de aminoácidos a la proteína nativa no modificada expresada en la planta a partir de la cual se aísla el ácido nucleico.

En un constructo libre de terminador que comprende así dos copias del polinucleótido deseado, un polinucleótido deseado puede ser orientado de tal manera que su secuencia es el complemento inverso de la otra. El diagrama esquemático de pSIM717 en la Figura 3 ilustra tal disposición. Esto es, la cadena "tope", "superior" o "en sentido" del constructo comprendería, en la dirección 5' a 3', (1) un fragmento de gen objetivo, y (2) un complemento inverso de un fragmento de gen objetivo. En esta disposición, un segundo promotor que esta operativamente enlazado a ese complemento inverso del polinucleótido deseado producirá probablemente un transcripto de ARN que es al menos parcialmente idéntico en secuencia al transcripto producido a partir del otro polinucleótido deseado.

El polinucleótido deseado y su complemento inverso pueden estar separados por una secuencia de ADN espaciadora, tal como un intrón, que es de cualquier longitud. Puede ser deseable, por ejemplo, reducir la posibilidad de transcribir la copia complementaria inversa del polinucleótido deseado a partir del promotor opuesto insertando un intrón largo u otra secuencia de ADN entre el término 3' del polinucleótido deseado y el término 5' de su complemento inverso. Por ejemplo, en el caso de pSIM717 (Figura 3) el tamaño del intrón ("I") puede ser dimensionado de tal manera que el complejo transcripcional de Pi probablemente no alcance la secuencia del complemento inverso de gus-S antes de ser interrumpido o desalojado. De acuerdo con lo anterior, puede haber aproximadamente 50, 100, 250, 500, 2000 o más de 2000 nucleótidos posicionados entre las copias en sentido y antisentido del polinucleótido deseado.

Un polinucleótido deseado de la presente divulgación, por ejemplo, un "primero" o "segundo" polinucleótido tal como se describe aquí puede compartir identidad de secuencia con toda o al menos con parte de una secuencia de un gen estructural o elemento regulador. Por ejemplo, un primer polinucleótido puede compartir identidad de secuencia con una secuencia codificadora o no codificadora de un gen objetivo o con una porción de un promotor de ese gen objetivo. En una realización, el polinucleótido en cuestión comparte aproximadamente 100%, aproximadamente 99%, aproximadamente 98%, aproximadamente 97%, aproximadamente 96%, aproximadamente 95%, aproximadamente 94%, aproximadamente 93%, aproximadamente 92%, aproximadamente 91%, aproximadamente 90%, aproximadamente 89%, aproximadamente 88%, aproximadamente 87%, aproximadamente 86%, aproximadamente 85%, aproximadamente 84%, aproximadamente 83%, aproximadamente 82%, aproximadamente 81%, aproximadamente 80%, aproximadamente 79%, aproximadamente 78%, aproximadamente 77%, aproximadamente 76%, aproximadamente 75%, aproximadamente 74%, aproximadamente 73%, aproximadamente 72%, aproximadamente 71%, aproximadamente 70%, aproximadamente 69%, aproximadamente 68%, aproximadamente



67%, aproximadamente 66%, aproximadamente 65%, aproximadamente 64%, aproximadamente 63%, aproximadamente 62%, aproximadamente 61%, aproximadamente 60%, aproximadamente 59%, aproximadamente 58%, aproximadamente 57%, aproximadamente 56%, aproximadamente 55%, aproximadamente 54%, aproximadamente 53%, aproximadamente 52%, aproximadamente 51%, aproximadamente 50%, aproximadamente 49%, aproximadamente 48%, aproximadamente 47%, aproximadamente 46%, aproximadamente 45%, aproximadamente 44%, aproximadamente 43%, aproximadamente 42%, aproximadamente 41%, aproximadamente 40%, aproximadamente 39%, aproximadamente 38%, aproximadamente 37%, aproximadamente 36%, aproximadamente 35%, aproximadamente 34%, aproximadamente 33%, aproximadamente 32%, aproximadamente 31%, aproximadamente 30%, aproximadamente 29%, aproximadamente 28%, aproximadamente 27%, aproximadamente 26%, aproximadamente 25%, aproximadamente 24%, aproximadamente 23%, aproximadamente 22%, aproximadamente 21%, aproximadamente 20%, aproximadamente 15%, o aproximadamente 5% o al menos aproximadamente 1% de identidad de secuencia con un gen objetivo o con un elemento regulador objetivo, tal como un promotor objetivo.

Por facilidad, el término “polinucleótido deseado” incluye otros términos utilizados aquí tales como “primer polinucleótido”, y “segundo polinucleótido” o cualquier polinucleótido que es utilizado en un constructo de la presente invención para reducir la expresión de un gen o secuencia objetivos. Por lo tanto un “polinucleótido deseado” puede ser un primero o segundo polinucleótido o ambos.

En una forma más simple, un constructo de la presente divulgación no contiene dos copias del polinucleótido sino solamente una copia. De acuerdo con lo anterior el polinucleótido está enlazado operativamente a promotores tanto en sus términos 5´ como 3´. En esta disposición particular, se producirán transcritos de ARN que comprenden secuencias para cada cadena del dúplex de ADN. Un ejemplo de esta disposición se muestra en la Figura 3 como pSIM772.

Puede existir un casete libre de terminador como una molécula de ADN extracromosómica en una célula o puede estar integrado por cualquiera de una variedad de mecanismos en el núcleo, cromosoma, u otro ácido nucleico endógeno de la célula. Si el casete libre de terminador está integrado de manera estable en el genoma de la célula, puede ser posible entonces producir una línea celular, cultivo celular, tejido biológico, planta u organismo que comprende el casete en generaciones subsiguientes de la célula u organismo.

La expresión de tal constructo en una planta reducirá o evitará la expresión de los genes que despliegan bien sea identidad de secuencia compartida o complementariedad inversa con al menos una parte del polinucleótido deseado. Esta divulgación no está limitada por ninguna teoría o mecanismo en particular, pero los transcritos pueden, directa o indirectamente, afectar la actividad de una secuencia reguladora, tal como un promotor, que está asociado normalmente con la expresión de un gen objetivo en una célula; o el transcritos puede afectar negativamente la acumulación de un transcritos que es producido de manera endógena en la célula objetivo. De acuerdo con lo anterior, cualquiera o ambas de acumulación de transcritos y traducción de transcritos pueden ser alterados por la actividad del transcritos producido por el casete de expresión de la presente invención.

Una planta de la presente invención puede ser una planta monocotiledónea, por ejemplo, alfalfa, canola, trigo, pasto para césped, maíz, arroz, avena, cebada, sorgo, orquídea, iris, lirio, cebolla, banana, caña de azúcar y palma. Alternativamente la planta puede ser una planta dicotiledónea, por ejemplo, patata, tabaco, tomate, aguacate, pimienta, remolacha de azúcar, brócoli, casava, patata dulce, almidón, poinsettia, legumbres, alfalfa, soja, guisantes, judías, cocombro, uvas, brassica, zanahoria, fresa, lechuga, roble, maple, nogal, rosa, menta, calabaza, margarita y cactus.

El efecto de la molécula de ARN, que es producida por un casete de expresión libre de terminador de la presente divulgación, puede ser establecido midiendo, directa o indirectamente, el nivel de ácido nucleico o proteína objetivo en la célula o ambiente en el cual está presente el casete de expresión. Así, el efecto de un casete de expresión de la presente divulgación en la subregulación, supresión, reducción o prevención o eliminación de la expresión del gen objetivo puede identificarse por una reducción en la cantidad de transcritos de ARN que es producida por el gen objetivo, a una reducción en la cantidad del producto proteínico del gen objetivo, o ambos.

Un polinucleótido deseado de un constructo libre de terminador descrito aquí puede ser idéntico a, o compartir identidad de secuencia con diferentes clases de regiones de ADN, tales como (1) al menos parte de la secuencia que codifica un transcritos objetivo, (2) al menos parte del intrón de un gen que codifica un transcritos objetivo, (3) al menos parte del promotor de un gen que codifica un transcritos objetivo, (4) parte del terminador de un gen que codifica un transcritos objetivo, mediante el cual el polinucleótido no es un terminador, (5) la región 3´ no traducida de un gen, y (6) la región 5´ no traducida de un gen. Uno o más nucleótidos de cualquiera de estas regiones puede ser sometido a mutación, alterado, o sustituido para incrementar la identidad de secuencia con una secuencia objetivo o de alguna otra manera incrementar o potenciar el silenciamiento de la secuencia objetivo.

La localización de la secuencia objetivo, por lo tanto, puede estar en, pero no limitándose a, (i) el genoma de una célula; (ii) al menos un transcritos de ARN producido de manera normal en una célula; o (iii) en un plásmido, constructo, vector u otro vehículo de ADN o ARN. La célula que contiene el genoma o que produce el transcritos de ARN puede ser una célula de una bacteria, virus, hongo, levadura, mosca, gusano, planta, réptil, ave, pez o mamífero.

- Por lo tanto, el ácido nucleico objetivo puede ser uno que es transcrito normalmente en ARN a partir de un núcleo celular, el cual es a su vez traducido en un polipéptido de codificación. Alternativamente, el ácido nucleico objetivo puede no realmente ser expresado en una célula o tipo de célula particular. Por ejemplo, un ácido nucleico objetivo puede ser una secuencia de ADN genómico residente en un núcleo, cromosoma u otro material genético, tal como una
- 5 secuencia de ADN de ADN mitocondrial. Tal ácido nucleico objetivo puede ser de, pero no limitarse a, una región reguladora, una región no traducida de un gen o una secuencia no codificadora.
- Alternativamente, el ácido nucleico objetivo puede ser foráneo a una célula anfitriona pero estar presente o ser expresado por un organismo no anfitrión. Por ejemplo, un ácido nucleico objetivo puede ser la molécula de ADN o ARN endógena a, o expresada por, un parásito, virus o bacteria invasores.
- 10 Adicionalmente, el ácido nucleico objetivo puede ser una molécula de ADN o ARN presente o expresada por una célula enferma. Por ejemplo, la célula enferma puede ser una célula cancerosa que expresa una molécula de ARN que normalmente no es expresada en el tipo de célula no cancerosa.
- En plantas, el polinucleótido deseado puede compartir identidad de secuencia con un ácido nucleico objetivo que es responsable de una característica particular de una planta. Por ejemplo, un polinucleótido deseado puede producir un
- 15 transcripto que direcciona y reduce la expresión de un gen de polifenol oxidasa objetivo en una planta y, por lo tanto, modifica una o más características o fenotipos asociados con la lesión por mancha negra. De manera similar, un polinucleótido deseado puede producir un transcripto que direcciona y reduce la expresión de un ácido nucleico objetivo R1 asociado con almidón o un ácido nucleico objetivo de fosforilasa en una planta, modificando por lo tanto una o más características o fenotipos asociados con el endulzamiento inducido por el frío.
- 20 Un casete de expresión en un constructo de la presente divulgación puede ser flanqueado por una o más secuencias de frontera de ADN de transferencia ("T-ADN"). Cualquiera de los casetes de expresión descritos aquí, por ejemplo, pueden ser insertados en el T-ADN de un plásmido derivado de *Agrobacterium*, tal como un plásmido Ti de *A. tumefaciens*.
- Una secuencia de frontera puede comprender una secuencia que es similar a una secuencia de frontera de T-ADN de
- 25 *Agrobacterium* tradicional, pero realmente es una secuencia que es nativa a una planta, pero que puede facilitar la transferencia e integración de un ácido nucleico en otro. Por ejemplo, tales secuencias de frontera de ADN de transferencia derivado de plantas ("P-ADN") puede ser aislada a partir de patata (SEQ ID NO: 44), tomate (SEQ ID NOs: 45-46), pimienta (SEQ ID NO: 47), alfalfa (SEQ ID NO: 48), cebada (SEQ ID NO: 49) y arroz (SEQ ID NO: 50) mostrados en la tabla de secuencias en otro sitio de esta solicitud.
- 30 De acuerdo con lo anterior, cualquiera de los casetes de expresión descritos aquí pueden ser insertados en un ADN de transferencia que está delimitado por tales secuencias de frontera de P-ADN, las cuales son capaces de integrar el casete en otro ácido nucleico, tal como un genoma vegetal o un cromosoma vegetal.
- De acuerdo con lo anterior, un plásmido de *Agrobacterium*, que contiene un casete de expresión descrito aquí que no comprende una región de ADN que está involucrada en la formación y poliadenilación en el extremo 3' de un transcripto
- 35 de ARN, puede ser integrado de manera estable en el genoma de una planta a través de transformación mediada por *Agrobacterium*. La progenie de esa planta transformada, por lo tanto, continuará expresando los transcriptos asociados con el casete de expresión.
- Los promotores que son utilizados para iniciar la transcripción del polinucleótido deseado pueden ser constitutivos, preferidos para tejido o promotores inducible o permutaciones de los mismos. Promotores "fuertes" por ejemplo,
- 40 incluyen los promotores de ubiquitina-7 y ubiquitina-3 de la patata, y promotores de ubiquitina de maíz, arroz y caña de azúcar. También incluyen el promotor de actina de arroz, diversos promotores de subunidades pequeñas de rubisco, promotores de la activasa de rubisco, y promotores de la actina del arroz. Buenos promotores preferidos de tejidos que son expresados principalmente en tubérculos de patata incluyen los promotores de la almidón sintasa para enlazamiento de gránulos y los genes de la ADP glucosa pirofosforilasa. Hay diverso promotores inducibles, pero
- 45 típicamente, un promotor inducible puede ser un promotor sensible a la temperatura, un promotor inducido químicamente, o un promotor temporal. Específicamente, un promotor inducible puede ser un promotor Ha hSp 17.7 G4, un promotor de trigo wcs120, un promotor del gen Rab 16A, un promotor del gen de la [alfa]-amilasa, un promotor del gen pin2, o un promotor de carboxilasa.
- De acuerdo con lo anterior, para facilitar la identificación de una planta que ha sido transformada exitosamente con un
- 50 casete de expresión libre de terminador, puede ser deseable incluir dentro de la región delineada por las secuencias de frontera del ADN de transferencia un marcador seleccionable o filtrable. La inclusión de un marcador es un procedimiento estándar en la transformación mediada por *Agrobacterium* y se emplea para ser posible identificar fácilmente material vegetal transformado con éxito. En los casetes de expresión representados en las Figuras 1-4, por ejemplo, el marcador es higromicina fosfotransferasa ("hptII"), el cual confiere resistencia a la higromicina a una planta
- 55 que expresa el marcador. En tales casetes, por lo tanto, un terminador o una región de ADN que está involucrada en la formación del extremo 3 y poliadenilación de un transcripto de ARN esta enlazado operativamente a la secuencia de gen hptII. Otros marcadores seleccionables y filtrables pueden ser utilizados en vez del hptII.

Ejemplo

Ejemplo 1

Constructos de silenciamiento convencionales

5 La eficacia de diversos constructos de silenciamiento fue probada direccionando el gen reportador de beta glucoronidasa (gus) enlazado operativamente al promotor constitutivo fuerte del virus mosaico de higo, designado aquí como "Pi" (SEQ ID NO: 1). El sistema de pruebas es restrictivo porque la proteína gus es altamente estable. Así, solamente reducciones relativamente grandes en los transcritos de gus dan como resultado reducciones fenotípicamente detectables de niveles de proteína de gus. Los constructos más silenciadores contienen al menos una copia del mismo fragmento del gen gus de 304-bp (SEQ ID NO: 2), enlazado operativamente bien sea en la orientación sentido o antisentido a un promotor constitutivo fuerte y en algunos casos seguido por el terminador del gen de nopalina sintasa de Agrobacterium. Los constructos silenciadores fueron insertados cerca a un casete de expresión para el gen marcador seleccionable de higromicina fosfotransferasa (hptII) entre las fronteras de T-ADN de los vectores de transformación. Los vectores resultantes fueron utilizados para retransformar una planta de tabaco que ha sido transformada antes con un T-ADN que contenía un casete de expresión para el gen gus (véanse también las Figuras 1 y 2).

15 Los siguientes vectores de transformación fueron producidos para estudiar el papel de un elemento terminador en constructos silenciadores convencionales:

pSIM714: El vector de control negativo pSIM714, el cual no contiene un constructo silenciador.

20 pSIM718: El vector pSIM718, el cual contiene un fragmento del gen gus "en sentido" enlazado operativamente al terminador del gen de la nopalina sintasa (SEQ ID NO: 3) que representa estrategias descritas en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos No. 5,283,184 y 5,231,020. Este vector contiene el fragmento de gen gus enlazado operativamente en la orientación en sentido del promotor y seguido por el terminador.

pSIM140: Vector pSIM140, el cual es idéntico a pSIM718 excepto en que el constructo silenciador no contiene un terminador.

25 pSIM755: El vector pSIM755, el cual contiene un constructo "antisentido" que contiene un terminador que representa estrategias descritas en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,107,065 y 5,759,829. Este vector contiene el fragmento del gen gus enlazado operativamente en la orientación en sentido al promotor y seguido por el terminador.

pSIM758: El vector pSIM758, el cual es idéntico a pSIM755 excepto en que el constructo silenciador no contiene un terminador.

30 pSIM374: El vector pSIM374, el cual contiene un constructo que contiene un terminador que comprende fragmentos del gen gus tanto en sentido como antisentido y representa estrategias descritas en, por ejemplo, WO 99/53050A1. Este vector contiene dos copias del fragmento del gen gus, una en orientación en sentido y la otra en la orientación antisentido y separadas una de otra por un intrón, representado en SEQ ID NO: 4, e insertado entre el promotor y el terminador.

35 pSIM728 y 777: El vector pSIM728, el cual es idéntico a pSIM374 excepto en que el constructo silenciador no contiene un terminador. Vector pSIM777 es idéntico a pSIM728 excepto que el promotor P2 está en el otro lado del casete de expresión.

40 Vectores binarios que contienen los diversos constructos fueron introducidos en Agrobacterium. Se cultivaron diluciones a diez veces de cultivos cultivados durante la noche de las cepas resultantes, durante cinco a seis horas, se precipitaron durante 15 minutos a 2,800 RPM, se lavaron con medio líquido MS (Phyto Technology, KS) suplementado con sacarosa (3%, pH 5.7) y resuspendido en el mismo medio a 0.2 OD/600 nm. La suspensión fue usada entonces para infectar explantas de hoja de la planta transgénica de Nicotiana tabacum (tabaco) in vitro que expresaba el gen gus. Los explantes infectados fueron incubados durante dos días en medio de cocultivo (1/10 sales MS, 3% de sacarosa, pH 7.5) que contenía 6 g/L de agar a 25 [grados]C en una cámara de crecimiento Percival (fotoperiodo de 16/8 horas) y transferidos subsecuentemente a un medio de M401/agar (Phyto Technology) que contenía timentina (150 mg/L) e higromicina (20 mg/L). Los brotes resultantes fueron transferidos a un medio de enraizamiento libre de hormonas, y tres hojas de cada planta resultante fueron sometidas a tinción para expresión del gus.

45 La Tabla 1 muestra que todas las plantas retransformadas con pSIM714 desplegaron los mismos niveles de expresión de gus que la planta gus original, confirmando que la retransformación, proliferación de células individuales y regeneración no afecta negativamente la expresión del gen reportador.

50 La Tabla 1 también muestra que los constructos que representan los tres diferentes métodos de silenciamiento convencionales disparan el silenciamiento del gen gus con eficiencias variables. De acuerdo con lo que estaba

reportado en la literatura, el pSIM374 es el más efectivo. Aproximadamente la mitad de las plantas que fueron retransformadas con este constructo desplegaron al menos algún nivel reducido de actividad de gus. Los otros dos constructos soportaron una reducción en la actividad de gus en solo aproximadamente 6% de las plantas retransformadas.

- 5 De manera importante, la Tabla 1 también demuestra que la remoción del terminador disminuye dramáticamente la eficacia de los constructos de silenciamiento. Por ejemplo, el pSIM374 es más de seis veces más eficaz que su derivado libre de terminador, pSIM728. Difícilmente se observa alguna actividad con el pSIM758 libre de terminador.

Debe concluirse que el terminador juega un papel esencial en la optimización de la actividad de constructos de silenciamiento convencionales.

10 Ejemplo 2

Silenciamiento efectivo de gen con constructos libres de terminador que comprenden al menos dos copias de un fragmento de gen objetivo que dispara la transcripción convergente

Los siguientes vectores de transformación fueron producidos para estudiar el efecto de la transcripción convergente sobre el silenciamiento de genes (véase también Figura 3).

- 15 pSIM715: El vector pSIM715 contiene un constructo que comprende un primer segmento que consiste del fragmento del gen gus enlazado operativamente al promotor (Pi) y un segundo segmento en la orientación opuesta que consiste del mismo fragmento del gen gus enlazado operativamente al promotor constitutivo 35S del virus mosaico del coliflor, designado "P2" y representado en SEQ ID NO: 5, mediante lo cual el primero y segundo segmentos están separados por dos intrones diferentes.

- 20 pSIM717: El vector pSIM717 es idéntico al pSIM715 excepto en que los dos segmentos del constructo están separados por un intrón individual.

pSIM789: El vector pSIM789 es idéntico al pSIM717 excepto que el promotor P2 es reemplazado por un promotor P1.

pSIM771: El vector pSIM771 es idéntico al pSIM717 excepto en que el promotor P1 es reemplazado por el promotor de la ubiquitina-7 de patata, el cual está representado en SEQ ID NO: 6 y denominado aquí "P3".

- 25 0175 pSIM770: El vector pSIM770 es idéntico al pSIM717 excepto en que el promotor P2 que guía la expresión del gen marcador seleccionable es reemplazado por P1, y el promotor P1 del constructo silenciador es reemplazado por P2.

pSIM772: El vector pSIM772 contiene el fragmento del gen gus insertado entre dos promotores diferentes orientados de manera opuesta, P2 y P3.

- 30 pSIM756: El vector pSIM756 es idéntico al pSIM717 excepto en que los fragmentos del gen gus están orientados en la orientación complementaria inversa con respecto al promotor al cual están enlazados inmediatamente.

pSIM779: El vector pSIM779 es un ejemplo de una repetición en tándem de los fragmentos del gen gus insertados entre dos promotores convergentes.

pSIM787: El vector pSIM787 es similar al pSIM779 pero contiene cuatro repeticiones directas del fragmento de gen objetivo insertadas entre los promotores convergentes.

- 35 El pSIM1111 es idéntico al pSIM779 excepto en que las cuatro repeticiones directas están precedidas por un fragmento de ADN antisentido del gen gus que es diferente de SEQ ID NO: 2 y representado como SEQ ID NO: 7.

Los ensayos con el gus llevados a cabo sobre plantas gus retransformadas demuestran que todos los constructos libres de terminador probados que contienen dos segmentos, conteniendo cada uno un promotor diferente que guía el fragmento del gen de gus, en la orientación complementaria inversa, pSIM715, 717 y 756, 771 son más eficaces en silenciar el gen gus que el pSIM374, el constructo que representa la mejor metodología convencional. Adicionalmente, el pSIM789 también confiere el silenciamiento efectivo del gen a muchos de los transformantes dobles.

- 40

El experimento también muestra que el uso de un fragmento de gen gus individual (pSIM779) no es tan eficaz. Este resultado sugiere que la transcripción convergente de al menos dos copias del polinucleótido deseado es importante para un silenciamiento efectivo.

- 45 El experimento también mostró que un constructo con dos repeticiones directas (pSIM780) disparaba el silenciamiento del gen. Sin embargo, esta disposición no fue tan efectiva como la organización de repetición invertida de pSIM756 (Tabla1). Adicionalmente, cuatro repeticiones directas (pSIM787) son más efectivas que las repeticiones directas (Tabla 1).

Para estudiar la base molecular del silenciador libre de terminador, se aisló ARN a partir de tres plantas que habían sido retransformadas con pSIM717 y tres plantas adicionales retransformadas con pSIM715. En cada caso, una planta representaba un evento de silenciamiento no efectivo mientras que las otras dos plantas desplegaron un silenciamiento de gen *gus* casi completo.

5 Se llevaron a cabo reacciones en cadena de transcripción reversa de polimerasa (RT-PCR) para estudiar la producción de transcritos a partir de los dos promotores diferentes usados en pSIM715 y pSIM717. El primer cebador usado para estos experimentos (PG, mostrado en SEQ ID NO: 8) es específico para una secuencia del fragmento de gen *gus* y se fusiona a transcritos producidos a partir de cada cadena. El segundo cebador fue diseñado para fusionarse a secuencias intrón de una de las cadenas solamente (pIF, mostrada en SEQ ID NO: 9, fusionarse a una secuencia de la región espaciadora derivada del intrón GBSS de los transcritos producidos por el promotor P1 y PIR, mostrado en SEQ ID NO: 10, se fusiona a transcritos producidos por el promotor P2). De manera interesante, estos estudios demostraron que el constructo de las plantas no silenciadas 717-7 y 717-13 contenían solamente transcritos producidos a partir de una de las dos cadenas, bien sea T1 o T2 (Figura 7). En contraste, las plantas silenciadas 715-19, 715-38, 717-55 y 717-36 produjeron transcritos a partir de ambas cadenas (Figura 7). Así, el silenciamiento efectivo es logrado solamente si ambos promotores del constructo están funcionalmente activos simultáneamente.

La hibridación de siembras en gel de ARN subsecuente con sondas marcadas radioactivamente derivadas del gen *gus* demostró que el silenciamiento efectivo en 715-38, 715-55, 717-12, 717-36 y 717-19 está correlacionado con un descenso fuerte en la acumulación de ARN de *gus* (Figura 8). Adicionalmente, los transcritos producidos por el constructo silenciador en plantas completamente silenciadas se encontró generalmente variable en tamaño desde aproximadamente 0.2 kb hasta aproximadamente 1.0 kb (Figura 8). Aunque la RT-PCR reveló la presencia de transcritos grandes adicionales que comprenden no solamente el polinucleótido sino también secuencias promotoras corriente abajo, la presencia de tales transcritos podría ser difícilmente detectada sobre siembras en gel de ARN. Por ejemplo, la hibridación con una sonda derivada del promotor P1 requirió un tiempo de exposición de siete días antes de que pudiera observarse un trazo extremadamente débil.

### 25 Ejemplo 3

#### Silenciamiento en tubérculos de patata

Se desarrollaron diversos vectores para probar el concepto del silenciamiento libre de terminador en tubérculos. Estos vectores contenían un casete de expresión para el gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) como sistema marcador seleccionable (véase también la Figura 6). Los promotores de guía usados para el silenciamiento del gen en tubérculos de patata fueron seleccionados del grupo consistente de: (1) el promotor fuerte de ubiquitina-7 de patata, (2) el promotor fuerte de tubérculo y específico para estolona del gen del enlazamiento en gránulos de almidón sintasa (GBSS) (SEQ ID NO: 12), y (3) el promotor fuerte específico de tubérculos del gen de ADP glucosa pirofosforilasa (AGP) de patata (SEQ ID NO: 13). Véase la Figura 4 para mapas de los ADN de transferencia.

35 pSIM764: El vector pSIM764 contiene un constructo "silenciador de tubérculo" que comprende un primer segmento que consiste del elemento de tracción 154-bp del gen PPO expresado en tubérculo de patata (SEQ ID NO: 14) enlazado operativamente al promotor GBSS y un segundo segmento en la orientación opuesta que consiste del mismo fragmento de arrastre enlazado operativamente al promotor GBSS con lo cual el primero y segundo segmentos están separados por el intrón del gen de ubiquitina-7 de patata representado en SEQ ID NO: 15.

40 pSIM765: El vector pSIM765 es idéntico al pSIM764 excepto en que los fragmentos del gen PPO están orientados en la orientación opuesta.

pSIM217 representa el plásmido de control y contiene las dos copias del gen PPO insertadas como repeticiones invertidas entre el promotor GBSS y los terminadores de ubiquitina.

45 Diluciones a diez veces de los cultivos cultivados durante la noche fueron cultivados durante 5-6 horas precipitadas durante 15 minutos a 2800 RPM, lavadas con medio líquido MS (Phytotechnology) suplementado con sacarosa (3%, pH 5.7) y resuspendidas en el mismo medio a 0.2 OD/600 nm. Las células resuspendidas fueron mezcladas y utilizadas para infectar segmentos internodales de 0.4-0.6 mm de la variedad de patata "Ranger Russet". Los tallos infectados fueron incubados durante dos días en medio de cocultivo (1/10 de sales MS, 3% de sacarosa, pH 5.7) que contenía 6 g/L de agar a 22 [grados]C. En una cámara de crecimiento Percival (16 horas de luz) y transferidas subsecuentemente al medio de inducción de callus (CIM, medio MS suplementado con 3% en sacarosa 3, 2.5 mg/L de zeatina ribósido, 0.1 mg/L de ácido naftaleno acético, y 6 g/L de agar) que contenían timentina (150 mg/L) y kanamicina (100 mg/L). Después de un mes de cultivo sobre CIM, los explantes fueron transferidos a un medio de inducción de brotes (SIM, medio MS suplementado con 3% de sacarosa, 2.5 mg/L de zeatina ribósido, 0.3 mg/L de ácido giberélico GA3, y 6 g/L de agar) que contenían timentina y kanamicina (150 y 100 mg/L respectivamente) hasta que surgen los brotes. Los brotes que surgen al extremo del período de regeneración fueron transferidos a un medio MS con 3% de sacarosa, 6 g/L de agar y timentina (150mg/L). Las plantas de silenciamiento fueron transferidas al suelo y colocadas en una cámara de crecimiento (11 horas de luz, 25[grados]C). Después de tres semanas, al menos 3 minitubos/línea fueron ensayados en cuanto a la actividad de PPO. Para este propósito, se pulveriza 1 g de tubérculos de patata en nitrógeno líquido, se

5 agrega a 5 ml de (ácido 3-(N-morfolino) propano-sulfónico en MOPS regulador (pH 6.5) que contenían 50 mM de catecol, y se incubó a temperatura ambiente con rotación durante aproximadamente 1 hora. La fracción sólida fue precipitada, y el sobrenadante fue transferido a otro tubo para determinar la actividad de PPO. Para este propósito, 1 g de tubérculos de patata fue pulverizado en nitrógeno líquido. Este polvo fue agregado luego a 5 ml de MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propano-sulfónico) regulador (pH 6.5) que contenía 50 mM de catecol, y se incubó a temperatura ambiente con rotación durante aproximadamente 1 hora. La fracción sólida fue precipitada entonces, y el sobrenadante fue transferido a otro tubo para determinar la actividad PPO midiendo el cambio de OD-410 con el tiempo. El experimento demostró que el pSIM764 y 765 disparan el silenciamiento efectivo en tubérculos de patata (Tabla 2). Una comparación con datos presentados en la WO 2003/069980 demuestra que el método de la presente invención puede ser más efectivo que el del silenciador de gen bajado del terminador convencional tal como lo ejemplifica por pSIM217 el control PPO.

Ejemplo 4

Silenciamiento de genes múltiples en tabaco

15 Se crearon dos constructos para estudiar el efecto de la posición de fragmentos de genes dentro del constructo de silenciamiento. Para este propósito, las dos copias del fragmento del gen *gus* de pSIM771 fueron reemplazados por dos copias del fragmento de gen *gus* enlazadas a un fragmento del gen de polifenol oxidasa (PPO) de tabaco (SEQ ID NO: 16) (también, véase Figura 6).

pSIM774: El vector pSIM774 contiene un constructo de silenciamiento teniendo los fragmentos del gen *gus* inmediatamente enlazados al promotor y los fragmentos del gen PPO adyacente enlazados al intrón central.

20 pSIM775: El vector pSIM775 contiene un constructo de silenciamiento con los fragmentos del gen de PPO inmediatamente enlazados a los promotores y los fragmento del gen *gus* adyacentes enlazados al intrón central.

Se espera que la retransformación de las plantas *gus* con esos vectores disparen el silenciamiento tan eficientemente como el pSIM771.

Ejemplo 5

25 Silenciamiento de genes múltiples en patata

El silenciamiento de genes múltiples es implementado direccionando simultáneamente tres genes de tubérculo de patata indeseables.

30 El plásmido pSIM1121 (Russet Boise II) comprende un ADN de transferencia completamente inactivo representado en SEQ ID NO: 17 que comprende un constructo de silenciamiento que comprende dos copias de un segmento de ADN, separadas por el intrón del gen de ubiquitina-7 de patata y posicionado como repetición invertida entre dos promotores GBSS convergentes, mediante lo cual el segmento de ADN comprende (i) un fragmento de la guía del gen de polifenol oxidasa expresado en el tubérculo del pariente de la patata silvestre *Solanum verrucosum* Schldl. TRHRG 193, número de acceso 498062 (véase: USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN). [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Available: <http://www.ars-grin.gov2/cgi-bin/npgs/html/acchtml.pl?1392998>, 12 de septiembre de 2005) (SEQ ID NO: 18) (ii) un fragmento de la guía del gen fosforilasa L (SEQ ID NO: 19), y (iii) un fragmento de la guía del gen R1 (SEQ ID NO: 20).

40 El empleo de este plásmido hace posible producir plantas de patatas transformadas que contienen solamente ADN nativo y despliegan las siguientes características nuevas: (1) tolerancia a las lesiones debido a silenciamiento del gen PPO expresado en tubérculos, (2) acumulación reducida de glucosa inducida por el frío debido a silenciamiento de los genes de fosforilasa y R1

Ejemplo 6

Direccionamiento de promotor altamente efectivo

Los siguientes vectores de transformación fueron producidos para demostrar que las secuencias del promotor objetivo pueden ser utilizados para silenciar la expresión del gen objetivo (véase también Figura 4).

45 pSIM773: El vector pSIM773 contiene un constructo que comprende un primer segmento que comprende el promotor P3 enlazado a P1, y un segundo segmento, el cual está orientado en la orientación opuesta, y que comprende el P2 enlazado a P1. El primero y segundo segmentos están separados por un intrón. Así, este constructo contiene cuatro promotores activos funcionalmente. Los dos promotores en el medio son idénticos, representan el promotor objetivo, y está en orientación convergente. Los dos promotores externos son diferentes uno de otro y en orientación convergente. 50 Todos los cuatro promotores contienen una caja TATA y llegan hasta un par de bases corriente arriba desde el inicio de la transcripción.

pSIM1101: El vector pSIM1101 es idéntico al pSIM773 excepto en que el promotor P3 fue reemplazado por el terminador nos.

5 pSIM788: El vector pSIM788 es similar al PSIM773 excepto en que los dos promotores P1 centrales del gen gus objetivo contienen solamente secuencias corriente arriba de la caja TATA (SEQ ID NO: 21), representando así promotores no funcionales.

pSTM1120: El vector pSIM1120 es similar al PSIM 773 excepto en que los dos promotores centrales del gen objetivo carecen de una caja TATA y no están en orientación convergente si no divergente.

pSIM1112: El vector pSIM1112 contiene un promotor P1 no funcional sencillo insertado entre los promotores P2 y P3 convergentes.

10 pSTM1113: El vector pSTM1113 contiene dos promotores Pi convergentes separados por un intrón.

pSTM754: El vector de control pSIM754 contiene el promotor P1 que guía la expresión del promotor P2 y viceversa.

15 La retransformación de las plantas gus con pSIM773 produjo 35 plantas resistentes a la higromicina. El análisis por PCR confirmó la presencia del ADN de transferencia de pSIM773. Sorprendentemente, la tinción de gus subsecuente reveló un silenciamiento completo extremadamente efectivo del gen gus (Tabla 1). Veinte plantas (el 57%) no presentaron ninguna expresión de gus detectable. Así, el direccionamiento del promotor utilizando la estrategia pSIM773 es altamente deseable.

Se obtuvieron resultados similares con los promotores objetivo en orientación divergente insertados entre dos promotores guía convergentes, con 77% de las plantas que habían sido retransformadas con pSIM1120 mostrando un silenciamiento completo del gen gus (Tabla 1).

20 La Tabla 1 muestra que el silenciamiento del gen también fue logrado utilizando un promotor objetivo individual insertado entre dos promotores guía convergente (pSIM1112). Sin embargo, este método puede ser menos efectivo que los métodos que emplean dos copias del promotor objetivo orientadas como repetición invertida.

Adicionalmente, la eficacia de pSIM1113 demuestra que los promotores de guía no siempre son necesarios. Es posible silenciar efectivamente un gen simplemente empleando dos promotores objetivo convergente (Tabla 1).

25 Muchas (44%) de las plantas que fueron retransformadas con pSIM1101 también desplegaron silenciamiento completo del gen (Tabla 1). Este hallazgo demuestra que el silenciamiento basado en promotores no requiere transcripción convergente.

30 Se ha encontrado frecuentemente que los métodos de silenciamiento convencionales no proveen silenciamiento de genes estables en generaciones subsecuentes. En contraste, los constructos de cuatro promotores representados por pSIM773 dieron un silenciamiento completo que se mantiene completamente por transmisión del casete de silenciamiento a la siguiente generación. La estabilidad potenciada fue demostrada permitiendo que plantas de tabaco transformadas dobles maduraran, y determinando subsecuentemente los niveles de expresión de gus en progenies T1. Este estudio demostró que el 100% de las plantas de la progenie que eran derivadas de una planta con pSIM773 y contenían ambos genes gus y el casete de silenciamiento desplegaron silenciamiento completo del gen gus (Tabla 3).  
35 En contraste, ninguna de las plantas T1 que portaba el gen gus y el casete de silenciamiento pSIM374 desplegaron un silenciamiento completo del gen gus (Tabla 3). Se observó un fenotipo intermedio analizando la progenie de una planta que portaba el gen gus y el casete de silenciamiento de pSIM717 (Tabla 3).

#### Ejemplo 7

##### Requerimientos de secuencia para direccionamiento del promotor

40 Los experimentos anteriores demostraron que las secuencias promotoras pueden ser útiles para disparar efectivamente el gerenciamiento de genes. Sin embargo, no debía entenderse que implican que cualquier fragmento promotor del gen objetivo podría ser empleado para este propósito.

45 Para estudiar los requerimientos de secuencia para el silenciamiento basado en promotores, se crearon dos vectores que comprenden dos copias de solamente parte del promotor P1 insertadas como repeticiones invertidas entre los promotores guía.

pSIM1118: El vector pSIM1118 contiene dos copias de un fragmento de 300-bp corriente arriba del promotor mostrado en SEQ ID NO: 11.

pSIM1119: El vector pSIM1119 contiene dos copias de una región central de 300-bop del promotor P1 mostradas en SEQ ID NO: 51.

La retransformación de plantas *gus* con los dos diferentes constructos produjeron 34 y 20 plantas, respectivamente, que fueron analizadas histoquímicamente. De manera interesante, ninguna de las plantas analizadas desplegó ninguna expresión reducida de *gus*, indicando que los fragmentos de promotores empleados no dispararon efectivamente el silenciamiento del gen (Tabla 1).

- 5 La figura 9 muestra un análisis de secuencia de los diversos fragmentos promotores. El fragmento que facilita el silenciamiento efectivo del gen está presente en pSIM773, 788, 1101 y 1120 pero no en pSIM1118 y 1119.

Ejemplo 8

Endulzamiento por frío reducido en tubérculos de patatas de patata que contienen un constructo de silenciamiento que comprende dos copias de un fragmento del promotor del gen R1

- 10 La secuencia del promotor del gen R1 asociado con el almidón de la patata, incluyendo el codón de guía y de inicio, se muestran en SEQ ID NO: 22. Se insertaron dos copias de un fragmento de promotor R1 corto (342-bp) (SEQ ID NO: 23) como repetición invertida entre dos promotores orientados convergentemente del promotor GBSS (en el plásmido pSIM1038) o un promotor GBSS y un AGP en orientación convergente (en el plásmido pSIM1043). Los vectores binarios resultantes fueron utilizados para producir plantas de patata transformadas. Se permitió que estas plantas  
15 desarrollarán tubérculos, y los tubérculos fueron almacenados durante aproximadamente 1 mes o más a 4[deg.]C. El análisis de glucosa de los tubérculos almacenados en frío demostrará que las plantas almacenadas acumularon menos glucosa que las plantas de control no transformadas. La acumulación reducida de glucosa disminuirá la formación de color durante el procesamiento de patatas fritas y, así, hace posible reducir el tiempo de blanqueo y preserva más del sabor original de la patata. Adicionalmente, el silenciamiento del gen R1 mediado por promotor limitará la fosforilación del almidón, y por lo tanto, reduce los problemas ambientales relacionados con la liberación de aguas residuales que  
20 contiene almidón de patata. Otros beneficios de los tubérculos transformados incluyen: (1) las patatas fritas resultantes contendrán menos cantidades del compuesto tóxico acrilamida, el cual se forma a través de una reacción entre la glucosa y la asparagina, y (2) las patatas fritas resultantes desplegarán un fenotipo más crujiente, según fue evaluado por paneles sensoriales profesionales, debido a la estructura ligeramente alterada del almidón.

- 25 Pueden obtenerse resultados similares empleando una parte más corta (151-bp) del promotor R1, mostrada en SEQ ID NO: 24. El vector binario pSIM1056 comprende dos copias de este fragmento insertadas como repetición invertida entre dos promotores GBSS convergentemente orientados; el pSIM1062 comprende los fragmentos insertados entre los promotores GBSS y AGP orientados convergentemente. Este vector fue utilizado para producir 25 plantas transformadas, de las cuales se puede demostrar que presentan acumulación de glucosa reducida inducida por el frío y todos los beneficios asociados con esa característica.  
30

Ejemplo 9

Tolerancia a lesiones de mancha negra potenciada en tubérculos de plantas de patata que contienen un constructo de silenciamiento que comprende dos copias de un fragmento del promotor del gen de polifenol oxidasa

- 35 La secuencia del promotor del gen de polifenol oxidasa expresado en tubérculos de patata se muestran en la SEQ ID NO: 25. Se insertaron dos copias de un fragmento de promotor PPO de 200-bp (SEQ ID NO: 26) como repetición invertida entre los promotores GBSS y AGP convergentes. Se utilizó un vector binario que comprende este constructo de silenciamiento, designado como pSIM1046, para producir 25 plantas de patata transformadas. Se dejó que las plantas desarrollarán tubérculos, y los tubérculos pueden ser analizados en cuanto a la actividad de polifenol oxidasa. Tales análisis mostrarán que el nivel de expresión del gen PPO direccionado es reducido si se compara con los niveles en controles no transformados.  
40

De manera similar, el plásmido pSIM1045, el cual contiene dos copias de un fragmento del promotor PPO de 460-bp (SEQ ID NO: 27) insertada entre los promotores GBSS y AGP convergentes, puede ser utilizado para disminuir la expresión del gen PPO.

- 45 Pueden utilizarse estrategias similares en otras especies de cultivo para limitar las lesiones. Por ejemplo, el promotor del gen PPO expresado en las hojas de lechuga puede ser utilizado para reducir las lesiones en hojas de lechuga, el promotor del gen PPO expresado en frutas de la manzana puede ser utilizado para reducir las lesiones en la fruta del manzano, y el promotor del gen PPO expresado en semillas del trigo puede ser utilizado para reducir las lesiones en los órganos del trigo. En todos los otros casos, el promotor puede ser aislado de manera directa diseñando cebadores que se fusionan a las secuencias del gen PPO conocidas, llevando a cabo métodos de aislamiento de ADN bien conocidos  
50 tales como PCR inversa.

Ejemplo 10

Contenido mejorado de aceite en semillas de plantas de canola que contienen un constructo silenciador que comprende dos copias de un fragmento del promotor del gen Fad2



5 La secuencia del promotor del gen Fad2 de Brassica, que contiene guía, intrón y codón de inicio, se muestra en SEQ ID NO: 28. Dos copias de un fragmento de este promotor que carecen de cualquier secuencia transcrita tal como el fragmento 441-bp mostrado en SEQ ID 29 puede ser colocado como una repetición invertida entre dos promotores orientados de manera convergente que son expresados en semillas de Brassica. Ejemplos de promotores “guía” son: el promotor de un gen de napina (gen de la proteína de almacenamiento en semilla 1.7S) mostrado en SEQ ID NO: 30 o el promotor de un gen de estearoil-ACP desaturasa (SEQ ID NO: 31).

El casete de silenciamiento puede ser colocado dentro de la secuencia del ADN de transferencia de un vector binario, y este vector binario puede ser utilizado para transformar Brassica. Algunas de las plantas resultantes producirán semillas que contienen cantidades incrementadas de ácido oleico.

10 Otros promotores que pueden ser utilizados en constructos de silenciamiento para mejorar la composición en aceite en cultivos de semillas oleaginosas tales como canola, soja, algodón y girasol incluyen promotores de otros genes de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. Por ejemplo, un promotor de una desaturasa 12 de ácidos grasos objetivo, o de una desaturasa de ácidos grasos omega 6 microsómicos, gen (FAD12) (por ejemplo Genbank Accession Nro. AF243045 para canola y AB188250 para soja) tal como el promotor FAD12 de soja mostrado en SEQ ID NO: 32 pueden ser usados para incrementar los niveles de ácido oleico en cultivos tales como canola y soja.

15 Adicionalmente promotores de los genes de la delta 9-desaturasa de la proteína portadora de estearoil acilo de algodón y de la oleoil-fosfatidil-colina omega 6-desaturasa pueden ser utilizados para incrementar los niveles de ácido esteárico y ácido oleico, respectivamente, en algodón. Este promotor puede ser identificado ejecutando métodos tales como PCR inverso utilizando la secuencia conocida de los genes objetivo (Liu et al., Plant Physiol 129:1732-43,2002). Dos copias del promotor recién aislado pueden ser utilizadas entonces en estrategia similares a las mostradas para pSIM773 con lo cual los promotores específicos para la semilla “guía” pueden representar bien sea ADN foráneo o ADN nativo.

#### Ejemplo 11

Contenido de lignina reducido en el sistema vascular de plantas de alfalfa que contienen un constructo silenciador que comprende dos copias de un fragmento del promotor del gen Comt

25 El promotor del gen de ácido cafeico/ácido 5-hidroxiferulico 3/5-O-metil transferasa (COMT) de Medicago sativa (alfalfa), que incluye la guía, se muestra en SEQ ID NO: 33.

30 Dos copias de un fragmento promotor de 448-bp que carece de las secuencias transcritas (SEQ ID NO: 34) fue insertado como una repetición invertida entre dos promotores guía orientados de manera convergente. Este primer promotor guía es el promotor del gen petE mostrado en SEQ ID NO: 35; el segundo promotor es el promotor del gen Pal mostrado en SEQ ID NO: 36. Un vector binario que comprende este constructo de silenciamiento, designado como pSIM1117, fue utilizado para producir plantas de alfalfa transformadas. Los tejidos de tallos de las plantas fueron ensayados y demostraron contener niveles reducidos de lignina.

35 El contenido de lignina reducido fue determinado de acuerdo con el siguiente protocolo: (i) se cortan secciones de tallo y se colocan sobre vidrios de reloj, (ii) se sumergen los tallos cortados en permanganato de potasio al 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente, (iii) se descarga la solución de permanganato de potasio utilizando una pipeta desechable y se lavan las muestras dos veces con agua para retirar el exceso de permanganato de potasio, (iv) se agrega HCl al 6% (V/V) y se deja que el color de las secciones cambie de negro o pardo oscuro a pardo claro, (v) si es necesario, se agrega HCl adicional para facilitar la remoción del color oscuro, (vi) se descarta el HCl y se lavan las muestras dos veces con agua, (vii) se agregan unas pocas gotas de solución al 15% de bicarbonato de sodio (algunas veces puede no disolverse completamente), se desarrolla un color rojo oscuro o rojo púrpura para maderas duras (más alto en unidades S) y color pardo para maderas blandas (más alto en unidades G).

40 Se probaron diez y nueve líneas de alfalfa transformadas para contenido reducido de lignina, y se encontró que seis plantas acumulaban cantidades reducidas de la unidad S de la lignina.

45 En vez del promotor del gen COMT, también es posible utilizar el promotor del gen cafeoil CoA 3-O-metiltransferasa (CCOMT). La secuencia de este promotor, junto con la guía corriente abajo, se muestra en SEQ ID NO: 37. Un fragmento de SEQ ID NO: 29 que carece de la secuencias transcritas está representado en SEQ ID NO: 38 que puede ser usado para disminuir el contenido de lignina.

50 De la misma manera, puede reducirse la lignina en árboles utilizando promotores de genes involucrados en la biosíntesis de lignina. También es posible utilizar SEQ ID NO: 59 y reducir el contenido de lignina en maíz empleando la metodología de silenciamiento basada en promotores descrita más arriba.

#### Ejemplo 12

Vida útil incrementada de frutas de plantas de tomate que contienen un constructo de silenciamiento que comprende dos copias de un fragmento del promotor del gen de poligalacturonasa.

Un promotor de un gen objetivo de poligalacturonasa como el promotor de tomate mostrado en SEQ ID NO: 39 puede ser utilizado para reducir la ruptura de la pectina, haciendo así más lenta la degradación de la pared celular, retardando el ablandamiento, potenciando las características de viscosidad, incrementando la vida útil del tomate insertando dos copias del fragmento promotor como repeticiones invertidas entre promotores convergentes de guía específicos para frutas.

Ejemplo 13

Alergenicidad reducida y alimentos de plantas que contienen un constructo de silenciamiento que comprende dos copias de un fragmento del promotor de los genes que codifican alérgenos

El promotor del gen principal de alérgeno Mal d 1 de manzana puede darse empleando métodos de PCR inversa utilizando la secuencia de gen conocida (Gilissen et al., J Allergy Clin Immunol 115:364-9, 2005), y este promotor puede ser utilizado entonces para desarrollar variedades de manzana que contienen niveles de alergenidad inferiores.

De la misma manera, el promotor del alérgeno principal de cacahuete Ara h 2 (Dodo et al., Curr Allergy Asthma Rep 5, 67-73, 2005) puede ser aislado utilizando métodos de PCR inversa, y usado para desarrollar variedades de cacahuete que contiene niveles de alergenidad inferiores.

Adicionalmente, el promotor del alérgeno Gly m Bd 30 K principal de soja (Herman et al., Plant Physiol 132, 36-43, 2003) puede ser aislado utilizando métodos de PCR inversa, y usado para desarrollar variedades de cacahuete que contienen niveles de alergenidad inferiores.

Ejemplo 14

Metodología de silenciamiento de genes múltiples con base en una combinación de fragmentos de genes y promotor

El plásmido pSIM870 (Russet Boise III) comprende el ADN de transferencia completamente nativo representado en SEQ ID NO: 40 que comprende (1) un primer casete de silenciamiento que comprende dos copias de un segmento de ADN posicionado como repetición invertida entre dos promotores GBSS convergentes con lo cual el segmento de ADN comprende (i) un fragmento de la guía del gen de polifenol oxidasa expresados en tubérculos de Solanum verrucosum, (ii) un fragmento de la guía del gen de fosforilasa L, y (iii) un fragmento de la guía del gen de fosforilasa L (SEQ ID NO: 41), y (2) un segundo casete de silenciamiento que comprende dos copias del promotor R1 posicionado como repetición invertida entre los promotores de guía de los genes AGP y GBSS, respectivamente

El plásmido pSIM899 (Russet Boise IV) comprende un ADN de transferencia completamente nativo representado en SEQ ID NO: 42 que comprende un primer casete de silenciamiento que comprende dos copias de un segmento de ADN posicionado como repetición invertida entre dos promotores de GBSS convergentes con lo cual el segmento de ADN comprende (i) un fragmento de la guía del gen de polifenol oxidasa expresada en tubérculos de Solanum verrucosum, y (ii) un fragmento de la guía del gen de fosforilasa L, y un segundo casete de silenciamiento que comprende cuatro copias de la guía del gen R1 enlazado operativamente al promotor AGP y seguido por una repetición invertida que comprende un fragmento en sentido y antisentido del gen R1.

La transformación de patata con cualquiera de estos tres plásmidos producirá plantas que, en comparación con plantas no transformadas, despliegan las siguientes características: (1) expresión reducida del gen de polifenol oxidasa expresada en tubérculos y, consecuentemente, (i) contenido de polifenol en tubérculos incrementado tal como puede ser determinado por xx, y (ii) tolerancia potenciada a la lesión por mancha negra de tubérculo tal como puede ser determinado por xx, y (2) la expresión fuertemente reducida de los genes de fosforilasa y R1 y, consecuentemente, (i) fosforilación reducida de almidón y, consecuentemente, contenido disminuido de fosfato de aguas residuales que contiene almidón de fosfato, y (ii) una conversión reducida de almidón en glucosa durante el almacenamiento en frío según se determina utilizando el reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa (Megazyme, Irlanda), dando como resultado (a) menos caramelización, y consecuentemente formación de color reducida durante el freído lo cual hace posible almacenarlo a temperaturas más altas y/o blanquear por periodos de tiempos más cortos (b) formación menor de acrilamida, y (c) patatas fritas más crujientes.

Ejemplo 15

Direccionamiento de intrón

El polinucleótido incrementado para generar un constructo TFCT puede contener el intrón de un gen que produce el transcritpo objetivo. El concepto de silenciamiento dirigido por intrón puede ser mostrado utilizando el intrón del gen que es expresado en el tabaco transgénico.

El siguiente vector de transformación fue producido para demostrar que las secuencias del intrón objetivo pueden ser utilizadas para silenciar la expresión del gen objetivo (véase también Figura 5):

El vector pSIM782, el cual contiene un constructo que comprende un primer segmento que consiste del intrón del gen gus enlazado operativamente al promotor (P1) y un segundo segmento en la orientación opuesta que consiste del mismo intrón del gen gus enlazado operativamente a un segundo promotor constitutivo (P2) con lo cual el primero y segundo segmentos están separados por un intrón.

- 5 Un ejemplo de un intrón que puede ser usado para silenciar un gen es el intrón del gen R1 asociado con almidón de *Solanum vernei* SEQ ID NO: 44. El silenciamiento del gen R1 es reducido al grado de endulzamiento inducido por el frío en tubérculos durante el almacenamiento.

Ejemplo 16

Direccionamiento del terminador

- 10 El polinucleótido usado para generar un constructo TFCT puede comprender secuencia corriente debajo de las secuencias transcritas de un gen objetivo. Este concepto puede ser demostrado utilizando las secuencias corriente abajo a partir del gen gus que es expresado en tabaco transgénico.

Ejemplo 17

- 15 Contenido reducido de lignina en el sistema vascular de plantas de alfalfa que contienen un constructo de silenciamiento que comprende dos copias de un fragmento del gen Comt

- 20 Un vector binario designado como pSTM856 fue ensamblado de forma que comprende un casete de expresión que comprende dos fragmentos de gen Comt representados en SEQ ID NOs: 52 y 53, posicionado como repetición invertida entre dos promotores de alfalfa convergentes mostrados en SEQ ID NOs: 54 y 55 de tal manera que los promotores está enlazados operativamente a primero el fragmento antisentido y luego al fragmento en sentido. El casete de expresión es insertado entre secuencias derivadas de alfalfa que funcionan como reemplazo para fronteras de *Agrobacterium* y que se muestran en SEQ ID NOs: 56 y 57. El ADN de transferencia completo, representado en SEQ ID NO: 58 es insertado en un plásmido que porta un casete de expresión para el gen ipt de *Agrobacterium* en su esqueleto.

- 25 Las transformaciones fueron llevadas a cabo como se describen en Weeks y Rommens, solicitud de Patente de los Estados Unidos US 20050034188A1. Se probaron dos plantas transformadas en cuanto al contenido de lignina, y se encontró que ambas no acumulaban visiblemente la unidad S.

Tablas

Tabla 1. Eficacia de constructos convencionales y de silenciamiento libres de terminador

Constructo para transformación	2 <sup>a</sup>	Plantas de tabaco probadas	Expresión de gus			
			50-100%	10-50%	1-10%	0%
Ninguno	3	3 (100%)	0	0	0	
PSIM714	8	8 (100%)	0	0	0	
PSIM374	36	13 (36%)	11 (31%)	9 (25%)	3 (8%)	
PSIM718	35	33 (95%)	1 (3%)	1 (3%)	0	
PSIM728	23	15 (65%)	5 (22%)	3 (13%)	0	
PSIM715	37	10 (27%)	11 (30%)	15 (41%)	1 (3%)	
PSIM717	35	11 (31%)	3 (9%)	19 (54%)	2 (6%)	
pSIM754	38	38 (100%)	0	0	0	
PSIM755	36	35 (97%)	0	0	1 (3%)	
pSIM756	37	18 (49%)	12 (32%)	5 (14%)	2 (5%)	
PSIM758	29	29 (100%)	0	0	0	

ES 2 530 671 T3

PSIM770	38	35 (92%)	3 (8%)	0	0
PSIM771	35	20 (57%)	3 (9%)	9 (26%)	3 (9%)
PSIM772	35	34 (97%)	0	1 (3%)	0
PSIM773	35	15 (43%)	0	0	20 (57%)
PSIM774	35	31 (89%)	2 (6%)	2 (6%)	1 (3%)
PSIM775	36	22 (61%)	6 (17%)	7 (19%)	1 (3%)
PSIM777	36	33 (92%)	1 (3%)	1 (3%)	1 (3%)
PSIM778	36	32 (89%)	2 (6%)	2 (6%)	0
PSIM779	36	33 (92%)	1 (3%)	2 (6%)	0
PSIM782	35	34 (97%)	0	1 (3%)	0
PSIM787	32	20 (63%)	7 (22%)	3 (9%)	2 (6%)
PSIM788	35	14 (40%)	0	0	21(60%)
PSIM789	35	19 (54%)	4 (11%)	6 (17%)	6 (17%)
PSEM1101	34	14 (41%)	0	5 (15%)	15 (44%)
PSIM1111	36	21 (58%)	9 (25%)	6 (17%)	0
pSIM1112	36	33 (92%)	1 (3%)	0	2 (6%)
pSIM1113	34	24 (71%)	2 (6%)	3 (9%)	5 (15%)
PSIM118	34	34 (100%)	0	0	0
PSIM1119	20	20 (100%)	0	0	0
pSIM1120	35	8 (23%)	0	0	27 (77%)

Tabla 2. Actividad de PPO en minitubérculos de patata. “wt” = plantas tipo silvestre no transformadas; “401” = plantas transformadas que portan un ADN de transferencia que comprende solamente un casete de expresión para el gen marcador seleccionable nptII, “OD” = medición de OD260, “S.E.” = error estándar.

Control	rep-1 (OD)	rep-2 (OD)	rep.3 (OD)	% de WT	S.E.
wt-1	0.127	0.121	0.137	87	2.6
wt-2	0.129	0.141	0.125	89	2.7
wt-3	0.138	0.146	0.123	92	3.7
wt-4	0.134	0.157	0.159	101	4.4
wt-5	0.152	0.173	0.169	111	3.6
wt-6	0.153	0.152	0.151	103	0.3
wt-7	0.173	0.158	0.187	112	2.4
wt-8	0.149	0.165	0.152	105	2.7

ES 2 530 671 T3

401-1	0.138	0.155	0.174	105	5.7
401-2	0.182	0.193	0.163	121	4.8
401-3	0.139	0.145	0.152	98	2.1
pSIM764	rep-1 (OD)	rep-2 (OD)	rep.3 (OD)	% de WT	S.E.
1	0.051	0.055	0.060	37	1.4
2	0.071	0.072	0.068	48	0.7
3	0.063	0.070	0.075	47	1.9
4	0.035	0.032	0.030	22	0.8
5	0.045	0.031	0.030	24	2.7
6	0.053	0.056	0.056	37	0.6
7	0.079	0.108	0.117	68	6.3
8	0.035	0.042	0.041	27	1.2
9	0.039	0.042	0.043	28	0.7
10	0.081	0.073	0.077	52	1.3
11	0.059	0.061	0.052	39	1.5
12	0.055	0.046	0.053	35	1.5
13	0.036	0.039	0.032	24	1.1
14	0.052	0.068	0.062	41	2.6
15	0.037	0.033	0.034	23	0.7
16	0.066	0.057	0.066	43	1.7
17	0.063	0.061	0.057	41	1.0
18	0.063	0.041	0.047	34	3.6
19	0.045	0.049	0.041	30	1.3
20	0.061	0.051	0.048	36	2.2
21	0.043	0.039	0.039	27	0.7
22	0.111	0.102	0.112	73	1.8
23	0.058	0.049	0.057	37	1.6
24	0.043	0.041	0.042	28	0.3
25	0.041	0.040	0.045	28	0.8
26	0.044	0.042	0.042	29	0.4

ES 2 530 671 T3

pSIM765	rep-1 (OD)	rep-2 (OD)	rep.3 (OD)	% de WT	S.E.
1	0.044	0.035	0.039	27	1.4
2	0.041	0.048	0.055	32	2.2
3	0.064	0.060	0.058	41	1.0
5	0.122	0.118	0.102	77	3.4
10	0.042	0.066	0.059	38	3.9
14	0.087	0.103	0.111	68	3.9
15	0.045	0.049	0.059	34	2.3
16	0.033	0.042	0.035	25	1.5
19	0.033	0.048	0.045	28	2.5
20	0.043	0.040	0.052	30	2.0
21	0.044	0.035	0.033	25	1.9
24	0.046	0.049	0.047	32	0.5
28	0.046	0.048	0.033	29	2.6
29	0.071	0.082	0.078	52	1.8
30	0.051	0.059	0.056	37	1.3
32	0.105	0.134	0.129	83	4.9
34	0.045	0.047	0.038	29	1.5
35	0.143	0.168	0.171	109	4.9
36	0.115	0.128	0.097	77	5.0
37	0.057	0.049	0.040	33	2.7
38	0.062	0.067	0.063	43	0.8
39	0.046	0.055	0.045	33	1.8
40	0.040	0.036	0.036	25	0.7
41	0.083	0.069	0.072	50	2.3

Tabla 3

Línea progenitora	PCR positiva para constructo de gen gus y silenciamiento	Parcialmente silenciado	Completamente silenciado
374-18	25/50 (50%)	24/25 (96%)	0
717-54	35/50 (70%)	28/35 (80%)	3/35 (9%)
773-4	23/50 (46%)	0	23/23 (100%)

Secuencias

SEQ ID NO:	NOMBRE (Si lo hay)	SECUENCIA
1	Promotor FMV ("P1")	ATTTAGCAGCATTCCAGATTGGGTTCAATCAACAGGTACGAGCCATATCA CTTTATTCAAATGGTATCGCCAAAACCAAGGAACTCCCATCCTCAAA GGTTTGTAAAGGAAGAATTCFCAGTCCAAAGCCTCAACAAGGTCAAGGTACA GAGTCTCCAAACCATTAGCCAAAAGCTACAGGAGATCAATGAGAGATCTTC AATCAAAGTAAACTACTGTTCCAGCACATGCATCATGGTCAGTAAAGTTCA AABAAAGACATCCACCGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCATCTTTGAAAGTAA ICTTTCAACATCGAGCAGCTGGCTTGTGGGGACCAGACAAAAGGAATG FPGCAGAAATGTTAGGCGCACCTACCAAAGCATCTTTGCCTTTATTGCAA AGATAAAGCAGATTCCCTAGTACAACTGGGGAACAAAATAACGTGGAAAA JAGCTGTCTGACAGCCACTCACTAATGCGTATGACGAAACGAGTGCAG JCACAAAAGAAATCCCTCTATATAAGAGGCATTCATTCCATTTGAAAGGA FCATCAGATACTCAACCAAT
2	Fragmento de gen gus de 304-bp	CAACCGTAAACTCGACCCGACCGCTCCGATCACCTGCGTCAATGTAATGT TCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGCGATCTCTTTGATGTGCTGTGCC TGAAACCGTTATTACGGATGATATGTCCAAAGCGCGCATTTGAAACCGCAG AGAAGGTACTGGAAAAGAACTCTGCGCTGGCAGGAGAACTGCATCAGC CGATTATCATCCGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCATCAA TGTACACCGACATGTGGAGTGAAGATATCAGTGTGATGGCTGGATAT
3	Terminador de pSIM718	CGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTCCCGGT CTTGGGATGATTATCATAATAATTCGTGTAATACGTTAAGCATGTAATA ATTAAACATGTAATGCATGACGTTAATTTATGAGATGGGTTTTTATGATAGA GTCCCGCAATATACATTTAATACGGGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCA AACTAGGATAAATATCGCGCGGGTGTATCTATGTTACTAGATCGGG
4	Intrón de pSIM374	GTGGTAACTTTACTCATCTCCCAATTAATTTCTGATTTTCATGCATGTTT CCCTACATCTATTAATGAATCGTGTATGGGTATAAACGTTGTTTCATAT CTCATCTCATCTATTTCTGATTTTCTGATTTCTGCTGCTACTGAAATTTGACCC ACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCTCTTCTTCTTCTCTCTCA GAAATCAATTTCTGTTTTGTTTTGTTTCACTCTAGCTTG
5	Promotor 35S de virus mosaico de coliflor ("P2")	TAGCTPCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGAACCTAACAGAACTCGCCGT AAAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAA GAAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCAGCACACTTGTCTACTCCAAAAA TATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAAGGGCAATFGAGACTTTTCAACA AAGGGTAAATATCCGGAACCTCCTCGGATTCCAATGGCCAGCTACTCTCA CTTTATTGTGAAGATAGTGA AAAAGGAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCA TTGCGATAAAGGAAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCCTGCGGACAGTGTCC CAAAGATGACCCCCACCCAGGAGGATCGTGGAAAAGAAAGACGTTCC AACCCAGTCTTCAAAGCAAGTGGATTTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAG GGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAAG AAGTTCAATTCATTTGGAGAGAACACGGGGACTC
6	Promotor de gen de ubiquitina-7 de patata	TCGAGCACATTCGATTGAGTTTTATATGCAATATAGTAATAATAAATATTT TCTTATAAAGCAAGAGGTCAATTTTTTTTTATATACCAACGTCACATAAAT TATATTTGATAAATGTA AAAACAATTC AATTTTACTTAAATATCATGAAATAA ACTATTTTTATAACCAATTAATAAATTTTTCCAATAAAAAAAGTCAATA AGAAGACATAAAAATAAATTTGAGTAAAAAGAGTGAAGTCGACTGACTTTTT TTTTTTTTATCATAAGAAAATAAATTAATACTTTAACCTAATAAAAACACTA ATAAATTTTCATGGAACTAATACTTACCTCTTAGAATAAGAAAAGTGT TTCTAATAGACCTCAATTTACATTAATAATTTTTCAATCAAAATTTAAATAA CAAAATCAATATGAGGTCAATAACAATAATCAAAATAATAAGAAAAGAG CAATACATAAATAAAGAAAGAAATTTAAGTGGGATTTCAAGGTAGTATT ATATCCATAATTTGCTAATAATTAACCTCTTATAATTAAGGTCATGTTTCATG ATAAATTTGAAATGCGCTATATTAGAGCATATATAAATAAAAAAATACC FAAATAAATAAATTAAGTTATTTTTTAGTATATATTTTTTACATGACCTACAT  TTTTCTGGTTTTTTCTAAAGGAGCGTGAAGTGTGACCTCATTTCTCCTAA TTTTCCCCACCACATAAAAATTA AAAAGGAAAGGTAGCTTTTGCCTGTGT TTTGGTACACTACACCTCATTATTAGACGCTGCTCCTCATATAATTTGGTTAAC CCTATGAGCGGTTTTCTGTAGAGTCCGCCATGCCATCTATAAATAAGAG TTCTGCACCTCATTTTTTCTATCTTCTATCTGATTTGTAATATAATTTCT CTCAATTTGCCTTCAAATTTCTCTTAAGGTTAGAAATCTTCTCTATTTTTG GTTTTTGTCTGTTTAGATTTCTCGAATTAGCTAATCAGGTGCTGTTATAGCC CTTA
7	Fragmento de gen gus antisentido	CTTTCACCGGTTGCGAGAGGTGCGGATTCACCACTTGCAAAGTCCCCTA GTGCTTGTCCAGTTGCAACCACCTGTTGATCCGCATCCGCAAGTCAACG CTGACATCACCTTTGGCCACCCTGCCAGTCAACAGACCGGTGGTTACAG TCTTGGCGACATGGCTCACCA

8	Cebador PG	CAACGCGTAAACTCGACCCGACGCGTC
9	Cebador PIF	TTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTCTGC
10	Cebador PIR	TGGAGGAGATGAGTAAAAGTTACCACG
11	Fragmento 5' de promotor P1 de 300-bp	ATTAGCAGCATTCCAGATTGGGTTCAATCAACAAGGTACGAGCCATATCA CTTTATTCAAATTGGTATCGCCAAAACCAAGAAGAACTCCCATCCTCAA GGTTGTAAAGGAAGATTCTCAGTCCAAAGCCFCAACAAGGTCAGGGTACA GAGTCTCCAAACCATTAGCCAAAAGCTACAGGAGATCAATGAGAATCTTC AATCAAAGTAAACTACTGTTCAGCACATGCATCATGGTCAGTAAAGTTCA GAAAAGACATCCACCGAAGACTTAAAGTTAGTGGGATCTTTGA
12	Promotor de gen GBSS de patata	GAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAAAATAATGCAACAAAATCTAGTGG AGGGACCAGTACCAGTACATTAGATATATCTTTTATTACTATAATAATAT TTAATTAACACGAGACATAGGAATGTCAAGTGGTAGCGGTAGGAGGAGT TGGTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCAGGAGGGGCCATTGCAA GGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAGAGAGGGCCCATATAC TGTGATGAGCATTCCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCCTCCGCTAA GGGATAGCCAGCCGCTATCTCTTGACAGGTGTCACTGAAACCCTGCATCAA ATAAGGCAGGCCCTCCTCATTCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAAC AAGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATATATTCGTGATTCATGCATGT TTCCCTACATTCTATATGAATCGTGTGATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG ATCTCATCTCATCTATTCGATTTGATTTCTCTGCCTACTGATTAATGATG CTACTGTAATCGGTGATTAATGTGAATGCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CAGAAATCAATTTCTGTTTTGTTTTGTTTCATCTGTAGCTTGGTAG
13	Promotor de gen AGP de patata	CCGCACTGTGCCAGGGCTGTCCGGCAGATGGACATAAATGGCACACUGCTUG GCTCGTGGAAAGAGATGGTCAAGTTTCAATGATAAGTATTACTCGTATTC GGTGTTCATCAAGTTAATAATGTTCAACACATGTGATATCATAACATCCA TTAGTTAAGTATAAATGCCAATTTTTACTTTGAATCGCCGAATAAATTTAC TTACGTCCAATATTTAGTTTTGTGTGTCAAACATATCATGCACATTTGAT TAAGAATAAATAACGATGTGAATTTGAAAACCAATAGAAAAGAAGTAT GACGGGATGATGTTCTGTGAAATCACTGGTAAATTTGGACGGCAGATGAAA TTTGTATCGTCCATTTAAGCATAGCAACATGGGCTTTTAGTCATCATCATTA TGTTATAATATTTTTCTTGAAACTTGATACACCAACTTTTCAATGGGAAAGT GACAGCATAGTATAAATATAATATCAATCTCGCAATTTGCAATTTATTC AAATCTCTTTTGTGATTTCAATTTCCCTCCCTATGTCGTGCAAGTACCAATTA TTAAGTACAAAAAATCTTGATTAACAATTTAATTTCTCACTAATAATCA CATTAATCATCAACGGTTCTATACAGTCTGTCACTCTTTTTTATTTCTCT CAAGCGCATGTGATCATACCAATTTAATAACAAAAAATCTTGATTTAA CAATTCAGTTTTCTCACTAATAATCACATTTAATCATCAACGGTTCATACAC
14	Guía de 154-bp de gen PPO de patata	TTAGTCTCTATTGAATCTGCTGAGATTACACTTTGATGGATGATGCTCTGT TTTTGTTTTCTTGTCTGTTTTTTCTCTGTGGAAATCAGCTTTGTGTCTT GATTTCAATTGAAGTTGTTATTCAGATAAATCAGTTACAAATTAATGTTTGG G
15	Intrón de gen de ubiquitina-7 de patata	GTTAGAAATCTTCTATTTTTGGTTTTGTCGTGTTAGATTCTCGAATTA GCTAATCAGGTGCTGTTATAGCCCTTAATTTTGTAGTTTTTTTTCGGTTGTT TTGATGGAAGAGCCATAAATTTGAGTTTTTTTACGTTGGTTTGTATGAAA AGGCCACAAATGGAGTTTTCCCGTTGTTTTGATGAAAAGCCCTAGTT TGAGATTTTTTTCTGTCGATTCGATTTAAAGGTTAAATTAAGATTGATTTT TACATTTGTTTGAAGAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTTTCCGTTGATTT GATGAAAAGCCCTAGAAATTTGTTTTTTTCCGTCGGTTGATTTCTGAAGGC CTAAAATTTGAGTTTCTCCGGCTGTTTGTATGAAAAGCCCTAAATTTGAG TTTCTCCGGCTGTTTTGATGAAAAGCCCTAAATTTGAGTTTTTCCCGT GTTTTAGATTTGTTTTGTTTTAATTTCTCGAATCAGCTAATCAGGGAGTGTGA AAAGCCCTAAAATTTGAGTTTTTTTCCGTTGTTCTGATTTGTTGTTTTATGA ATTTGCAG
16	Fragmento de gen PPO de tabaco	TTAGTCTCTATTGAATCTGCTGAGATTACACTTTGATGGATGATGCTCTGT TTTTGTTTTCTTGTCTGTTTTTTCTCTGTGGAAATCAGCTTTGTGTCTT GATTTCAATTGAAGTTGTTATTCAGATAAATCAGTTACAAATTAATGTTTGG G



<p>17</p>	<p>ADN de transferencia de Russet Boise II</p>	<pre> TGGCAGGATATATACCGGTGTAAACGAAGTGTGTGGTTGATCCAAAATC TATCGTACCTTTAGAAAAGTGTAGCTATGAAGGATAGTCTCCTATTAGAGA ACTACCTATTGAGATTCCTGATCGTCAGGTCGGAAGGTTGAGAAAAATAGA AGTCGCTTCACTTACGGCTTTGTGGAGGAGTAAGGGTACCGAACCATGCAT CTCAATCTTAATACTAAAAATGCAACAAAATCTAGTGGAGGGACAGTA CCAGTACATTAGATATATCTTTTATTACTATAAATAATTTTAATTAACA CGAGACATAGGAATGTCAAGTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAGTTT TTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCATGCAAGGCCCAAGTTG AAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGGCCATAAFACTGTGATGAGC ATTTCCCTATAAATACAGTGTCCACAGTTCGCTTCGCTAAGGGATAGCCAC CCGCTATTCCTTGACACGTGTCACTGAAACCTGCTACAAATAAGCCAGGC AGCTCCTCMTCTCACACTCACTCACTCACACGCTCAACAAGTGTACT TTTACTCACTCCTCCAATTAATTTCTGATTTTCATGCATGTTTCCCTACAT CTATTATGAATCGTGTATGGGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCA TCTATTCTGATTTGATCTCTGTGCTACTGAAATTTGACCCFACGTAAATC GGTGATAAATGTGAATGCTTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTCAGAAATCAAT TTCTGTTTTGTTTTGTTTCATCTGTAGCTTGGTAGATTCCTTTTGTAG ACCACACATCAGGATCCCAACATAAATGTAACATGATTTATTTCTGAA TAACAATTCBAATGAATCAAGCAACAAGCTGATTTCAACATGAAAAAC AGAACAAGAAAACGAAAAACAGACATCATCCATCAAGTGTAAATCTCAGCA GATTCBAATAGAGACTAACTCGAGGTGCTCTATGCAAACTAGCTTTTCG AATGAGATGATAAGAGAGTGAAGATTTGATTAATTTATTTGATGAGAT TGGAGAAATCAATTAATTCACACACAGGAATTAAGTGTGTTGTGTGC  GTCTCTTGTGAAATTAATGTACCCCTTTTTTTTATTTATCAATAAAAGC ACGAAAATCTCTGCCTACTCCCCTGCCTCTCTTATATTTGCTCCATTTCC CCAAAATCCCTAAGTTAATTACTTACCACACTCAAGCTTCAACACTGTT GAGGTTAGGAATCCCTGGTACAGCAAGTTATCCCTAAGGAATTAATCATA TCCCTCCACTGGCTAATTTCACTCAAGTTCACTAGAAAACGTCGATTTCTA GTGAAGTAACGAGGAATTTAGCGAAGAAGCGTCGAGAAATTCGATGAAGAT GAATTCACGAAGCAAAATGAAGATTTGGAGCAGAGAGTATGGGGATTCGAGA GTGGAAGTGGTAGTGAATAAGGTCGCGGGGTTAAAATTCATGATTTTATG AACTCAATAGCTTTTCATAATGAGCAATATTTATCTTTCTCAGTAGCAAA CCACATGCTCTTATGCTGCTGAATAGTTTGGCCGAGGATTTCAACAT CTATGTTTACAATGATTTCTGTAGCTGCAGACCTTATTTCACTACACCTT TCCACTCTCCAATCCCATACTCTCTGCTCCAATCTTCAATTTGCTTCGTC AATTCATCTTCATCGAATTTCTCGACGCTTCTTCGCTAATTTCTCGTTCAC TTCACATAGAAATCGACGTTTCTAGCTGAACTTGAGTGAATTAAGCCAGTGG GAGGATATGAGTAATTCCTTAGGGAATAACTTGGTGTACCAGGGATTCCTA ACCTCAACAGTGTGAAGCTTGAAGTGTGGTAAATAATTAAGTTAGGGAT TTGTTGGAAATGGACAATATAGAGAGTGCAGGGGAGTAGTGCAGGAGAT TTGCTGCTTTTATGATAAATAAAAAAGGGTGCATTTAATTTCCACAAAG AGGACGCAACACACACACTTAATTCCTGTGTGAAATCAATTAATTTGACTT CTCCAATCTTCATCAATAAATAAATTCACAATCCCTCACTCTCTTATCACTC TCATTCCGAAAAGCTAGATTTGCAATAGAGAGCACTTCGAGTTAGTCTCTAAT GAATCTGCTGAGATTAACACTTTGATGGATGATGCTCTGTTTCTGTTCTT GTTCTGTTTTTTCATGTTGAAATCAGCTTTCTGCTTGATTTCAATGAAGT TGTATTCAAGATAAATCAGTTACAATTAATGTTTGGGTCTAGAGTGAATG GTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAGCTACAGATGAACAAAACAAAA CAGAAATGATTTCTGAGAAGAGAGAGAGAGAGGAAGCATTCAATTTA TCACGATACAGTAGGCTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAAATCAAAATCAGA ATAGATGAGATGAGATATGAAACAACGTTTATACACCCATAACACGATTCAT AATGAAATGTAGGGAACATGCAATGAATCAGAAATTAATTTGGAGGAGATGA GTAAAGTTACCCTTGTGAGCTGTGTGAGTGAATGAGTGTGAGAAATGAG GAGGTGCTGCTTATTTGTAGCAGGTTTCACTGACACGTTGTACAGAGAT AGCGGGTGGCTATCCCTTAGCGGAAGGCAACTGTGGACACTGTATTTAAGG GAAATGCTCATCGACAGTATTTGGGCCCTCTCTTTGTGATTCACGGCTG GACTTCBACTTGGGCCCTGCAATGGGCCCTCCGGTCTGCTCCTAGTAT CTAAAAACTGAACCAACTCCCTCCTACCCTACCCTTGACATTCCTATG TCTCGTGAATTAATAATATATATATAGTAATAAAGATAAATCTAATGT ACTGTTACTGGTCCCTCCACTAGAATTTTGTGCTATTTTGTAGTATTAAGA TTGAGATGATGGTTGAGCTCCTTCAACATGTTATAAACTTCACATATTC AGTTGGAAATAGGCTTTAATAAGTGGACTACGTTATGTTCCCTCAAG TCCAGAAATATGTGCCCCGATGTTATAAGTCCCTCTGCGGGCATCAA TTTAGTGAATCAGCCAGACATGCTCTATACCTCGGCCAGGATATATTTGT TGGTAAAT                     </pre>
-----------	--	---

18	Fragmento de guía del gen PPO expresado en tubérculo de Solanum verrucosum	CCGAAACATAAATGTAACCTGATTTATCTTTGAAATAACAACCTCAATGAAAT CAAGCAACAAAGCTGATTTCAACATGAAAAACAGAAACAGAAAACGAAAA CAGAGCATCATCCATCAAAGTGAATCTCAGCAGATTCATAGAGACTAA
19	Fragmento de guía de fosforilasa	GTGCTCTCTATGCAAATCTAGCTTTTCGAATGAGAGTGATAAGAGAGTGAG GATTTGTGAATTAATTTATGATGAAGATTGGAGAAAGTCAATTTATGATTC CACACAGGAATTAAGTGTGTTGTGCGCTCTTGTGGAAATTAATGT CACCTTTTTTTTATTTATCAATAAAAGCACGAAAAATCTCCTGCCTACTCC CCTGCCTCTCTTATATTTGTCCATTTCCACAAATCCTCACTTAATTAC TTACCCACACTC
20	Fragmento de guía de R1	CAACACTGTTGAGGTTAGGAATCCCTGGTACAGCAAGTTATCCCTAAGGA ATTACTCATATCCTCCACTGGCTTAATTCCTCAAGTTCAAGTCAAGAACG TCGATTTCTAGTGAAGTACGAGGAAATTAGCGAAGAAGCTCGAGAAAT CGATGAAGATGAATTCAGCAAGCAAAATGAAGATTGGAGCAGAGAGTATGG GGATTGGAGAGTGGAAAGTGGTAGTGAATAAGGT
21	Promotor a1 P1 sin función sin caja TATA de pSIM788	ATTTAGCAGCATTCCAGATTGGGTTCAATCAACAAGGTACGAGCCATATCA CTTTATTCAAATTTGGTATCGCCAAAACCAAGAAAGAACTCCCATCCTCAA GGTTTGTAAAGGAAGAAATCTCAGTCCAAGCTCAACAAGGTCAAGGTACA GAGTCTCAAACCATTAGCCAAAAGCTACAGGAGATCAATGAAGAATCTTC AATCAAACTAAACTACTGTTCCAGCAGCATGCATCATGGTCAGTAAGTTTC GAAAAAGACATCCACCGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCTTTTGAAGATAA TCTTGTCAACATCGAGCAGCTGGCTTGTGGGGACCGACAAAAAAGGAATG GTGCAGAAATGTTAGCGCCACCTACCAAAAGCATCTTTGCCCTTATTTGCA AGATAAAGCAGATTCCCTTAGTACAAGTGGGGAAACAAATAACGTGGAAAA GAGCTGTCTGCAGCCACTCATAATCGGTATGAGGAACGCAGTACGA CCACAAAAGA
22	Promotor del gen R1 de patata	TTCAAATTCATTTGTGTCATATAAATGAGACATATAATTTGTCGGCACAT GCTCATGTATCCAAACCAAGGATAAATTTGATCATCTATTTCTATATATTTGA AAATTACGATAAATACTTTAAATCACAATAATTAACAAGTTAAATATTT TAAAAGTCATATAAATAAATTAATTTGACTCTCAAATTTCTGTAAGTACTATA AATTAATAAATAAATAAATAAATTTAGAAATTTCAAAGTCATAAATAAATTTGGTG GCTCTCAAAATATATCAATGTCACATAAAGTAACATATATTTATTCAGA AATTAAGTAAAGATAACCAAAATTAACAATAATTAACAACCTGAATAATTT AAATTAATAAATAAATAAATAAATTTAGAAATTTCAAAGTCATAAATAAATTTGGTG TGGGACACGAAATATAATACTATATTTTAAATTAATGTAATAAATA ATTTCTAAATCATGATAATTAATAACTTAAATAATTTTAAATAATCATATAA AAATTAATAAATAAATAAATAAATTTAGAAATTTCAAAGTCATAAATAAATTTGGTG AATAATAATAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA TATAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA TGATPATCTTTAATTTTCTACTCAGCATGGGGTCCCGTATCTAGTTTA TATAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA TGATTTATTTTAAATTTTCTACTAGGTAATGTAATAATCTTATGTAAAC CAATAAATGAGACAAATTAATTCAGTTAACAGAGTTAAGAGTAAAGTA CTATTGCAAGAAATATCAAAGGCAAAAGAAAGATCATGAAAGAAATAT CAAAGAAAGAAAGAGGTACAATCAAACCTCCATAAAACCTCCAAAAATAA ACATTCAAATTCAAAAACATCCAATCAATTTGCTCTACTTCACGGGGCCC ACGC
23	Fragmento de 342-bp del promotor del gen R1	AAAATCTTATGTTAACCAATAAATTTGAGACAAATTAATTCAGTTAACCA GAGTTAAGAGTAAAGTACTATTGCAAGAAATAATCAAAGGCAAAAGAAAAG ATCATGAAAGAAATATCAAAGAAAGAAAGAGGTTACAATCAAACCTCCCA TAAACTCCAAAATAAACAATTCAAATTTGCAAAAACATCCAATCAAATTTGC TCTACTTCACGGGGCCACGCGGCTGCATCTCAAACCTTTCCACGTGACA TCCCATACAAATCACCACCGTAACCTTTCTCAAACCTCGACACCTCACTC TTTTTCTCTATATTAACAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
24	Fragmento de 151-bp del promotor de gen R1	CATTCAAATTTGCAAAAACATCCAATCAAATTTGCTCTACTTCACGGGGCCCA CGCCGGCTGCATCTCAAACCTTTCCACGCTGACATCCCATAAACAATCACA CCGTAACCTTTCAAAACCTCGACACCTCACTCTTTTCTCTATATAC

<p>25</p>	<p>Promotor del gen PPO expresado en tubérculo de patata</p>	<p>YAAATATAACATAACCATGGGCGGAGCTAGAAATCTGATTALAAATTTGGTCA  AAATTCBACAATATTTGCTTAAATAATATATTTGTATAGTAATTTTTTTTAC  AAAATATATACAATTTAGCTCAAGGATTCAGTTATTAACCCCTTTAAAATC  GTGTCATAAAATTCBAATGTFAAAATTCGACTTTCCCGGTGCTTAAACATTA  CTTATCAAAATTTATGTTTCTGTGTAGAAAAGTACTAGTACTACTCTTTGAC  TCGTCTAGACGTCTACTATAGATCTCCTTAGATTAAAACCTCCAGTTTTAA  TATTTTCCTCACAATATATATCTTAATCTACCACCTACCGGAGTCAAAA  TATATTAATGAAAATATCTATCTATTAATTTATGATCTACCTATTGATA  ATTTGTAATCTAGTCAAAATGATGGCAAAAATAATAATATCTAGACTGA  AGTTCCTAGTCAATAGCGTAAATGAAAGAAAATAAAAGCTCAGAAAGA  AACATGATATCTTTGTTGCTCTGATTCGTAATAAAATAAACATAGTAACTT  CATAAAATATCTTATCTTTGGACAGAGCCGATGAAAATAATAATATCTAG  TAATACTGAGATTAGTTAACCAGACTATTTCCATCTCTGTTTGATTT  GATTTATTAAGGAAAATTAAGTTTCAACGGCCATGCTTATCCATGCAATTA  TAATGATCAATATATTAATAAATGCTATTAATAATAGGTTGCTTATATCTC  TGTAATACGGAATATGATGATAACTAATAATACATTAATTTCTCTAATA  AATCTATCAACAGAACCTAAGAGATTAACAAAATACACTATTAATCCAGAC  TAAGTTATTTTCTGTTTACTACAGATCCCTTCCAGAACAAAACTTAATA  ATTTGATGGCTGCTATACATAATCCCCACTACCGCTTCCGGAATAAT  GATATGGAAGCCCTCTAAAATGAATAATTAATCTGTTTACATAATAT  ATAA</p>
<p>26</p>	<p>Fragmento de 200-bp del promotor del gen PPO</p>	<p>AAGTTATTTTCTGTTTACTACAGATCCTTCCAAGAACAAAACCTTAATAA  TTGTATGGCTGCTATACATAATCCCCACTACCGCTTCCGGAATAATTTG  ATATGGAAGCCGCTTAAAATGAATAATATACTGTTTACATATTATA  TAAAGCAAGGTATAGCCCAATGAATTTTCATTCAAAAGCTAGCAATA</p>
<p>27</p>	<p>Fragmento de 460-bp del promotor del gen PPO</p>	<p>CTAGTAATACTGAGATTAGTTACCTGAGACTATTCCATCTCTGTTTGG  ATTTGATTTATTAAGGAAAATTAAGTTTCAACGGCCATGCTTATCCATGCA  TTTATTAATGATCAATATATTAATAAATGCTATTAATAATAGGTTGCTTATA  GTTCTGTAATACGGAATATGATGATAACTAATAATACATTAATAATTTCTC  AATAAATCTATCAACAGAACCTAAGAGATTAACAAAATACACTATTAATCC  AGACTAAGTTATTTTCTGTTTACTACAGATCCCTTCCAAGAACAAAACCT  AATAAATGATGGCTGCTATACATAATTTCCCACTACCGCTTCCCTGGAAT  AATFGAATGGAAGCCGCTCTAAAATGAATAATTAATCTGTTTACATA  TTATATAAAGCAAGGTATAGCCCAATGAATTTTCATTCAAAAGCTAGCAAT  A</p>
<p>28</p>	<p>Promotor del gen Fad2 de Brassica</p>	<p>ATFGAGCTTGAAGGAACATTCGAGCAGATAAAACGAAAGCAGGCGCAATGCTT  ACAGAGCTGATTGGGAGGCTTAATTCGGCATCTAGGAGACCACCTGGTGGC  GGTGGTGGCGGGGTGGGCTTGGTCTGAAGGGAAACACATCCAGGAAAGC  AACTTCAAGACGAGATGTGTGAGAGATTCCTAAAGCAAGCTGTACATTT  GGTGAATGATGTCACTTTGGCTACGGGGAAGCAGAGCTACGCGGCTCATGA  ATTTGCCCTTAGAGTTACTGGTGAACAAGTCTCTTTTCAATTTGTTGTGGTGA  TTCTAATATCATCTCTCTACTTGTTTTAGTTGTCTTCTGTTTTPGAA  ACTACAATGTTTAGTTTTCATTTGTGAGTSTAAGTTTCCCATTTGGTGT  TTTTTAGAATCTAGTTTGAATTTGAGATGGGCAAGCTTGATGAATGATG  GCAAAACAGTGGTTAGGATTTGTGTGCTGCTACTTAATATTTCAATGTT  TTATCTACTTTATTTTGGTCAGCAAGTTGATGTTTCTGTAATGTTGTG  TGATTATCAGCTTAGATTTATTTGTGATGATGCTAGACTGATAAATAATC  GTTGTGATGTTATAGTTCTCTTATAATGTTTGTATGACTATATAAATAA  AATTCATGTTATTAATAGCCGCTGCTGATAGTAACAGCTGAATAAATGAAA  TGAATCATGGTAGGTGATGATCTTAAAGAAATGTTAAAATAATGTTGTCG  TTATAAGCGGTAATGCATAGAAAACCTAATCATCTTAACATAAGAGAGA  GCGATAGCTTTAATAAAGTACTTAAATTAATTAATAGTGGCAGTGGCTGC  CTACTTGTGACCACTAATAATTAATTTATATAATATATGACGAATCTCCA  AAGTACATCACACACTCGGGCTATTACGTTGATCTCAACCAATGTC  TGCAGATATTTTTTAACTTTCTCTCACATGGGAGAGAGAGCCCAAG  CAGC</p>
<p>29</p>	<p>Fragmento de 441-bp de promotor Fad2</p>	<p>CCGGCTACCCTAATCTCTACAGTTCTACTTGTGAGTGGCAAGGACGTTT  CCTCATATFAAAGTAAAGACATCAAAATACCATAATCTTAATGCTAATTAAG  GTAACGGATGAGTTCTATAACATAACCCAACTAGTCTTTGTGAACATTAG  GATTTGGGTAACCAATATTTACATTTAAAACAAAATAAATAAAGAAACG  TGATAAATTTATAAAGCAATTAATGATCAGGCACTTTTTTCACTTTT  CCGTAATAATATATAAGTGGTGAATAATCAGATATTTGGAGTAGAAAAA  AAAAAAGAAAAAGAAATATGAAGAGAGGAATAATGGAGGGCCCACTT  GTAAAAAAGAAAAGAGATGCTACTCAATCGTCTCACAGGGCCCCCG  TCAATTTAAACGGCTGCTTCTGCCAATCGC</p>

<p>30</p>	<p>Promotor del gen de napina especifico de semilla</p>	<p>AAGCTTTCCTTCATCGGTGATTGATTCCTTTAAAGACTTATGTTTCTTATCT  TGCTTCTGAGGCAAGTATTCAGTTACCACCTATATCTGGACTTCTGACT  GCATCCTCATTFTTCCAACATTTAAATTTACATATGGGCTGAATGCTTCT  TCTTTGAGGAGAAACAATTCAGATGGCAGAAATGTATCAACCAATGCATA  TATACAAATGTACCTCTTGTCTCAAACATCTATCGGATGGTCCATTTG  CTTTGTCATCCAATTAGTGACTACTTTATATTTATTCACCTCCTTTTATAC  TATTTTCATGCGAGGTTGCCATGTACATATATTTGTAAAGGATGACGCTA  TFGAGCGTFTTCTTCAATTTCTTTATTTAGACATGGGTATGAAATGGT  TGTTAGAGTTGGGTTGAATGAGATATACGTTCAAGTGAATGGCATACCGT  CTCCAGTAAGGATGACCTACCCATTTCTTGAGACAAATGTTACATTTTAGTA  TCAGAGTAAATGTGTACCTATAACTCAATTCGATTTGACATGTATCCATT  CAACATAAATTAACCAGCCTGCACCTGCATCCACATTTCAAGTATTTTC  AAACCGTTCGGCTCCTATCCACCGGGTGTAAACAGAGGGATTCGGAATTTG  GAAGATTTGACTCAAAATTCCTCAATTTATATTTGACCGTGAATAAATCACT  TTAAGTCTTATAATTTCTGATTAAGCTCCCAATTTATATTTCCCAACGGCCT  ACCTCCAAATTTATAGACTCTCAFCCTTTTAAACCAACTTAGTAAACG  TTTTTTTTTAAATTTTATGAAGTTAAGTTTTTACCTTGTTTTAAAGAGA  ATCGTTCATAAGATGCCATGCCAGAACATTAGCTACACGTTACACATAGCA  FGCAGCCGCGAGAAATGTTTTTCTTCGCCACTTGTCACTCCCTTCABA  CTAAGAGCTTCTCTCTCACAGCACACATACAAATCACATGGGTGCATGC  1777</p>
<p>31</p>	<p>Promotor de Brassica napus especifico de semilla</p>	<p>CTGCAGGTACAAAGAGGAGCTCTACTTAGTTTATGACTTTATGCCCCAGTGG  AAGCCTTGACAAGTACCTCTACACCGAATCAGATCAGAAATATATGAAGTT  CACAAGAAAATCTTAGTATTTGTTTACTCTATCTTTCTATGTAATATGTT  TTTTGCTTTTCAAAAAGAGCTTTGAGAAAATTAAGAAAGATAACTTGTCT  TTAACCTATTTTGGTTCGGGTTTTCGGGAGAACTTTGAAAATTAATGACA  ACTAGGTGTTTTGCCCTCGATGCGGATTTAAACATTTTATAATTTTGA  AAGTTCTTGTACACTATATTTCAATATACTAATAAATCTTAAATTAAT  TAATATATATTTTAAATTAATAAATTAATAAACAATTTTATGATTAAT  TTAATTAATAATTTATGTTTTAACTTTTACTAATACTTTTTAGATA  CAATCAATACATATAATAGAAATATCTTTTTTTTAAATTAATTTTTTA  GATCTTGGATAATTTAATAATTAATTTTTATATATAAATTAAGAAATTTAT  TTGATTAATTTAGTTATATAATTCATGTTTTAACTTTATATAATAAT  TCATGTTTTTAACTTTTACTAATACTTTTTTACAGATAACATAACAAAT  ATACATAAATTAATCTCTTTTAAATTAATAATTTTACAGATTTGGATTAATGC  TTACTATTAATTTAATCAATTAATCTAATCAATTAATTAATTTTGG  TTTTATAGGATATAAAGCATATAATCATCTAATTTTAACTGAGAGTT  CGATTTCAAAAATTTACTTTCGCAAAATAATAGTATATCTAGCTTATTAGG  GCTTTAAAGGTTTAGGTTCTCTTACGCTTTAATTTGTTTTTTTAACTATA  ATTTGAAACGTTTAAACATACTAATCAGTGTAAACTTGCCTTATTTT  ATTTTTCCACTTTTAGATTAAGCATAAAGTGTACCATAAAAAGAAAGA  TTAAAGCATAAAGAGATAATCATTTGGTATAATATTTATGCCAACGTAATAT  TTGTTTTATCTTTTATGCAACGATACACATGTGGACTTGAAGAAGACG  ACAATGAGGACACTTACACCAACTCCCAAAATGTCACTTAAAGCTATAGT  TCTGTCACGGTCTCTCAATGGAAAATCGTGGTGTATCAATGAAAACCGT  TGTGCTGAACCTGGCAGAGCACAACCTATAGTCTAAAAGGATTTGATGA  AGCAAAAATGCAGAACCAAGGCACAACGATTTCTACATTTGAATGATA  TTAGAAATATTAGTTTCAATTTGCCAAGTGGACACATCCACGTTGATAGGA  CCCATGCCACTTGTCTCTTTCGTGGTCTCACGCCCGAGTTACATTTGAA  AATTAACAAAATAAAGACATTTTGTATATGATTTGACATTTTTACCTT  TATATACATTTGTTTATGATCTAAATTCACAACATAATCCATCTTATCAT  TTTAGTTAACTAAGAGCATCAATGTTAACCATGATTTCTAATTTGAAATTA  TTCAATTTGATATTTTATTTATTTTATTTTATATTTTTTGGTTAAAAC  AGCTCTTATATCTTTTATTTAAGAGATAGTTCTTAAATTTCTTAAATFAA  IGTTAAGAAACGGTTCTTAAACCAATGTAAAACCAATTTGTAAGAGCTCG  ATTTATATGATCTAAGGACTCACGACTCAATCACCFAATCAATCTA  AATATATAGATAATAGCTTTACGACATGTGATAGTGCAAAATAAATAA  ATAATATATAGACACAAGAAGGATGTGATAGTGAAGAACTGGAGGCACT  TTAGACTGATGCTCGATTAAAAACAGAAATAATCTCAAAATTTTAAAT  TACAGATAGATGACGTCATTTTCCATTTGTTTGTAAATAGTTATTTA  TTCTTCTCTCTCTTTCTCCGAGTGTAGACTCTTCCCTCAAACCGCTGT  TCTCATAACCATATTTCTTTCTGTTGGACGAAACTCAACCTTAAGAGACC  IGAGAGACATTTAGCCTAGAGAGGCTCGCTCGTGTCTGAAAGAACATCAA  ICTTGGTATCAAAAAGAAAGAA</p>

<p>32</p>	<p>Promotor del gen Fad12 de soja</p>	<p>CAGAAAAAGGGAATAGTTTGGATAAAAATAGATTTTAGGCTCTCAATTCCT                  AGTCAAAMTAGTCTCAATCATATGCTTTAAAATGATGATTTGACACT                  TGGGAGATAACAATATTTCTTAAAGTTTGGATTCCTCAAGTTNGTATATATGA                  AATAGTGTGTGGGAGAAGTAAACTCTTAAAATAAATTTTATATTTTAGA                  GATGATTCCTCATTTTATGAAGGAGATATAC TAGAAAAAATGATTTT                  TATTTTTTATTTTTTATTTATGAAACTTAAGAATTAAGATACCAGGATGAG                  GGACAAAAGTCATTAATTATTAATAAAAATACAGAATCAAGATTATTTAT                  TTTAAAATATAAAAAAATAATTTTGTATATAAAGAAATCCAGGGGAT                  ATAATACACACTCTATCCCAATAATTTGGTAAACCCCCAGGGGCCAATG                  TTTCGTCTTTCCCTCAACAGTATAAATGCTAATGATATTTATTTGCTGAA                  TTGGTTCCTGTGGCTAGCATATCTCTGCAACTTGTGCAACCATTTGGFAAT                  TCAATTAAGAATATAAATACTTTAAATTTACTAGGATGCATAAAAAAC                  CCTGTGACTTGTCTGACCAGACTTGCCAAATTTTTTATCATGCATTACA                  AAAACCAGCCATTTGTTTTATTTTTGGATTTCTATTTCTCCAAATGAA                  GGCTAACAGATAAATGCAATGCTAATTTCCCTTGTATTAGAGAAATA                  AGAATTAAGCTTTGCTTTGACTTTTGAACATATTTACACTTTTGC                  RGGTTGCTTTTATCTTGAAGACCAGAGGAGTCAAATAACAGTGTGCGG                  FTAAGTAAGTGTGCTGACATCTGGAATAGTCTCTTATTGCGTATTTGCC                  FCATTTGAGGCTTGTNGGCTTGCATCACCATTGAAAGAAATAGTTTGA                  RGGTAAAATGGTATACCTTTTGTCTTATTACTCGAATTACATTTAG                  AATC</p>
<p>33</p>	<p>Promotor del gen Comt de alfalfa</p>	<p>AAATGAAAGAGAGTTAAGGATGAAATGAAACTGGTAAAAAACAGCTTATI                  TFAAACATCTTATTCAAAACAACCTTATTTTATTAACAATTTATTTTA                  TTCAAAACATGTTTTGAAATAAGTTGTTTTTGAATAAAGCTGTTTTGAA                  AAGCTGTTTTTAAAATAAGGTTGTTTTTCATAAAAATAGTGTTTTTGTATA                  AATAAGTGTTTTTTCAAATAAGCTGTTTTGAAATAAGCTGTTTTTTTAA                  ATAAGTTGTTTTGAAATAAGCTGTTTTTTTAAATAAGTTGTTTTTTAAAT                  AAGCTGTTTTGAAATAAGTGTTTTTTAAATAAGGTTTGCATAAAAATAAG                  CTGTTTTGAATAAGTGTTTTGAATAAGTGTTTTTGAATAAGCTGTTTTT                  TTAATAAATAAATGTTTTTCAATAAATAAGCTGTTTTTAAATAAAGGTTGTT                  TGTATAAATAAGCTTTTTTAAATAAGCTATTCAATAAGTGTTTTTTTGG                  AAAGATCCAACAAGAGTTCAAGTGGTTCTTTAAAATAAATAAAGGTT                  CAAGTGGTTGGTTCGGTCAAACGGTTCGGTTCGGTTCAGATGGTTCGG                  TTATGGTTCAGAACCTGTTAATAAATAAAGCTTCGGTTCGGTTCAGACCTTA                  TAACGATTCGGTTATTTTTGGTTCGGTTCGGTTCGGTTCGGTTCGGTTCGGT                  TCATGGTTCTTTTGGCCACCCCTAAAAGAAAATAAATGAATGGTGGTGGAG                  TATTTCTAAAATGATTTGTTTTCTAGAATAAAGAGTTAATAAGGGGGTCAA                  AAGAGCAACCACTTAGGTAACCTCFCACATTAAGAGTTGATGCGGTTAA                  ATTTGGATATAACACTTTTGTGACCAAAATGCTCTTATGAATAGACTG                  AAGAGTAATAAATTAATAAATAAATAAATCCGGCTGTTGCATTTTTTAA                  CATTAATCCGAAAGAAAGATGTTTGAATAATGTTTAAATAAGAGATTAAT                  TTGAGTTTTTTCTCTTCAAATAAATAATGTTATTTTCATTAATGTTTAA                  ACCATAAATAACTTCTGTTTTTTTAAAGAAATCTCAAATAAATCAATTTCT                  AAACGTCAAAAGTTTTTATACAATAAGTTTAGGGTGTTCATAGAGGCTT                  TGATAATATTTCTACGACTATATATATTTTTTTTTTAAAGAAATCTACGA                  CTACTTGTAGTGGAAATAGGGAATACGACTACTTTTCTATGAAGAGCAGG                  FTACGGTAGACACAAAAGCTGACTCTTGGCAGAAAGCTTGTTCACCCATA                  FTGACATATTAGGAAATGAAAATAACCTAATGCCCTCTTTCAATACTCA                  AGAAAAGTCCCTTACCATAATGTCCCATTTCTTAAAGAGCAGAGAGA                  ICACATTTGTTTACACCAACATGATTTTTGTATGCTTGTAAATGAAAGCT                  PCTAGTTATCCAGCTCAACCCGTGACTAAGGTCTATTCAATTTGCTTAGAA                  ATGAGGATCAATATGATGCAAAATTTGTACTCATTACTCAATCAAAA                  ICTATATGAACTTGTGGTGTCAAGTAAAGTGAATAACACTATCAAAATTTGA                  FTACAGTACTTCTCCTGTACGGGGAGAAAACACTCAAATAAATGTTTA                  JAGATAAATTTGTATCATAAATTAATTAATTTTCAAAATTCATCAATAA                  IGTATTTGTTTAAATCAATAAATATATGACAAAATCTCTTTGAAATATACT                  JAGCAAAAACAAAATATTAATTTGCATGCAACGGCAACACATTTCTGTTTA                  :AATTATATTCGGTGGTACTCAGTCAATTAACCAATTAACCAATATG                  ICGAATTCCTTAGTGGTCCACATTTGGTGGTGGTGGTGGGACCCATTTG                  :AATGGATGGCCACATACCAAACTCAACCAAAATTTCTCATAAAGT                  :CTATATAATAGCAATCCACTTTGCATCATTTGAGG</p>
<p>34</p>	<p>Fragmento de 448-bp de promotor Comt</p>	<p>CACCAACATGATTTTTGTATGCTTGTAAATGAAAAGCTTCTAGTTATCCAG                  CTCAACCCGTGACTAAGGCTATTCATTTGCTTAGAAATGAGGCATCAAT                  TATGATGCAAAATTTTTGTACTCATTACTCAATTCAAAACATATATGAACTT                  ATGGTGTCCAGTAAAGTGAATAACACTATCTAAAATTTGAGTACTTCTCCTGT                  CACGGGGAGAAAACACTCAAATAAATGCATGCAACGGCAACACATTTCT                  TGTTTACAATATATTCGGTGGTACTCAGTCAATTAACCAATTAACCAATATG                  ATATGCAAGAAATCTCTTAGTGGTCCACATTTGGTGGTGGTGGTGGGAC                  CAATTTGATGGATGGCCACATACACCAACTCAACCAAAATTTCTCA                  TAAAGTTCTATATAAATAGCAATCCACTTTGCATCATTTGAG</p>

<p>35</p>	<p>Promotor del gen Pet de alfalfa</p>	<p>ATAGTGGACCAGTTAGGTAGGTGGAGAAAGAAATATTTAAAAAATATATT TATAFTGTTGTCAAAATAACTCAAAAATCATAAAAGTTTAAAGTTAGCAAGTGT GCACATTTTATTTGGACAAAAGTATTCACCTACTACTGTATPAAATCAT ATTAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAAGAATAAGAGTAGTGATA TTTTGACAACAATTTTGTACAACTTTGAGAAAATTTTGTGTCTCTCT TTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAGAGAAAAGGAAGGGGAGA ATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCA AAATGGTTGTACAAATATCATTTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAATAA GGTTAATTTGCTGTAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCAT TAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAARAAGAAAAGATAAATATTTTTAAAA TTAAAAGTTGAGTCATTTGATPAAACATGTGATTAATTTAATGAATTTGATGA GAGAGTTGGATTAAGTTGTATTAATGATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAA TTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTTGCCCATAGAGTCATTTAACTCA TTTTTATATTTCAATAGATCAAAATAGAGAAAATAACGGTATATTAATCCCTC CAACAATAAAAATAAAAACCGGTATATTTACTAAAATACTAAGCCACT AGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCAACAATCCTGATGAGATAACC CAGTTTAAAGCCGACGACTCTGTGGCAGATCTACATTAATCAATCACACA TTCTTCCACACATCTGAGCCACACAATAAACCABTCCACATCTTTATCTCC ATTCTPAAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCTTCAAAC ACATACAAAAGAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAAGC C</p>
<p>36</p>	<p>Promotor del gen Pal de alfalfa</p>	<p>AGAGAGGAGGCAGTGTACACAGGGGCAGAGAGAGGTGAGTCTCTTTCTGG TAGGGCTGGTGTGGGATAGTGGTTGGTTTGAGAGTCAGGTCAGGAGGAG GGTTGGCGATGGGGTTGATACGTTGTTTGGTTGGATAGGTGGTTAGGAGA TGCTCCTTTTGTGTTTGTTCAGGAGGTTGTTTGTAGTTAAACAGAGAAACAA ATTTGTGTCTGTGGCTAATTTGTTTCTGTTGACTCGGAGCAGTGGGGGGA GGTGTGAGGTGAACCGTATGTTGGCAGAGGTGGTGGCAGAGGTGAAGCGT ATGGTGGCAGCTGAGGGAGGCAGTGTACACAGAGGTGGAGAGAGAGGAGAG AGAAAGAGAGAAAGAGAGAGAAAATGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAG ACAAATTTTGTGTGTGACCAAAACCAAAATTTCTGGTCCGGTCCACAC TAGATTTTCTCCAACCAAGGTACAAGAAATACCACGATCCAAGAGTGCAC GTTGCCAACATCATAACCGTTCAATAGTAAGAGATAAATCGAAGGGCCATAAT TAATTTTCAACAAAACCCACTTTTCTCTACTTTTGCACCTTTGTCCTC ATCACCTACCAACACACATAGCACACCAACACACATATAATATATATAT AATTTAATAATATATGTAGCCTCCAATTAGAAAAGAAACCTCTATATAAAGC CTAATCTACTTCTTCACAAAATCAGGAAATTCACAATCTAATATTCATTTT TTTCCAAATCATTAGAATTTCCATTTCTATAAAAATTCAGGTACCACCA CACAAATAAAGGAACATTAATCAATACTATTAAGATGGATC</p>
<p>37</p>	<p>Promotor del gen Ccomt de alfalfa</p>	<p>CTTCTAATTAATGATTTAATCAACCTTTTTTAAAATACGAAGGTGACCTTAT TTTGCAAATTAATCCATGCATGGAATGCATCATCTTTTGAATGGGAT ATCTGAATCTTAAGTTACGTGAAAATTTAATACATTTCAATTTAGATAAA TTTATTTAATAATTCACACTTAGATGGCCAAAATAAATAACTTATTTT AACATTCAAAATAAATAFACGAGAAATGAGTGAATTAAGTTGGTTAAG CATCGTCAAGCTTGGAGAGAAAGATCATAGTTTGATCTTTGAAAACCTAC TATTTGAAAAGGTTGAAGATATCTAACATCCAACAAAATTTATTTTGATA GTCGATTCAAATFATCAAAAATTTGTGAAAATTTTGTAAATTTGTTAAGTT GGCAAAAATATGTTAATTTTCAAATTAACATTTGCACATTTTCTAATCTC AAATCACATTTAAGGGATGTGACTACTTTAGTTTGTACAAAATCTTTACA ATTTTAACTTTATAAATCTGTTTTCGGTAGATAAAAAGTGTGACTATTGT TTATAAGAGATTGTGTTTCTTTTGTAAACTTATAAAAATAAATATATA TTTTATTTTATTTAATGTGAGATTGTAAGAAATCATTTATAAGATTATGTC ATTCCTCAAAGAAAATTAGATGATGTCAATTTTCAATAACTCATTTTCTAT AAATACAGAAAATCCTCAAAAATGAAAACCTCAGTCAAAAATAAAGAA AAACATCAATAGTGGACTGGCCACACTCATTTGCTTTGCTTTAGTATAAGA AAGTAGACTCACCAACACGAAACCGGACGCAACCGGTTCAACCAAAAT TACACCAATTTCTTAACTACCGGTTTCTCCTCCCTTATAAACCAT CTTCTACTCTTATCTAACCAAGCTCCATTCACCTCTTCAACACATATCA GAAACAGAAAAGAAAGCAAACATTCCAAGAAATTTAACA</p>
<p>38</p>	<p>Promotor de 171-bp del promotor Ccomt</p>	<p>CATCAATAGTGGACTGGCCACACTCATTTGCTTTGCTTTAGTATAAGAAAG TAGACTCTACCAACCAGAACCGGACGCCAACCGGTTCAACCAACATTTAC ACGAATTTTCTTAACTTACCGGTTTTCCTCCCTTATATAACCATCTT CCTACGCTTATCTAACC</p>

<p>39</p>	<p>Promotor del gen de poligalacturonasa de tomate</p>	<p>AAGCTTCTTAAAAGGCCAATTGATTAAATTTGAAGTCAAAAATATTAATTA  TAACAATGGTAAAGCACCTTAAGAAACCCATAGTTTGAAGGTTACCAATGC  GCTATAATTAATCAACTGTAATATAAAAAAATTCATTCGAAAAGG  GCCTAAAATATTCRAAGTATTCGAATGGTACRAAACTCCATCCGTC  ACCTATTGACTCCAAAATAAATATTTATCCACCTTTGAGTTTAAATPGA  CTACTTATATAACAATCTAAATTTAAACTATTTTAACTCTTTAAAATA  CATGGCGTTCAAAATATTAATATAATTTAATTTATGAAATCATTATATAA  CCAAACCACTACCAACTCATTAAATCATTAATCCCAACCAATTCCTACTAT  CAAAATGTCCTAAACACTACTAAAACAAGACGAAATTTGTCGAGTCCGAA  TCGAGCACCACTCTAATTTAGGTTGAGCCGCATATTTAGGAGGACACTT  CAATAGTATTTTTTCAAGCATGATTTGAAATTTAGATTAATGTAAGG  AGTAGTACACCCGAATTAATTCATGCCCTTTTAAATATAAATATATBAA  TATTTATGATTTGTTTTAAATATAAATCTTGAATATATATTTTTAAAAA  AATATCTATTAAGTACCATCACTAATTTGAGACGAGGAATATTAAGATG  AACATAGTGTAAATAGTAATGGATGGGTAGTAATTTATTTATAAATTA  TATCAATAGTAAATTTAAACAATATTTGAGCGCCATGATTTTAAAAA  ATATTAATAAGTTTGAATTTAAAACCGTTAGATTAATGGTCAATTTTAAA  CCAAAAGTGGATGAGAGGGTATTTTAGAGCCATAGGGGATGAGAGG  ATATTTTGAAGCCAAATGATGATGGATGGAGGATATTTTGTATCAATTTCT  AATACTTTAAAGATATTTAGTCAATTTCCCTTCTTAGTTTATAGACTA  TAGT</p>
<p>40</p>	<p>ADN de transferencia de pSIM870 (Russet Boise III)</p>	<p>TGGCAGGATATATACCGGTGTAACGAAGTGTGTGTGGTTCATCCAAAATC  TATCGTACCTTTAGAAAGTGTAGCTATGAGGATAGTCTCACCTATGAAGA  ACTACCTATTGAGATTTCTGATCGTCAGGTCGGAAGGTTGAGAAAAATAGA  AGTCGCTTCAGTTACGGCTTTGTGGAGGAGTAAGGGTACCGAACCATGCCAT  CTCAATCTAATACTAAAATAATGCACAAAATCTAGTGGAGGGACCGATTA  CCAGTACHTTAGATATTAATCTTTTATTAATAATAAATTTTAAATTAACA  CGAGACATAGGAATGTCAAGTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAATTT  TTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCATTTGCAAGGCCAAGTTG  AAGTCCAGCCGTGAATCAACAAGAGAGGGCCCAATACTGTCGATGAGC  ATTTCCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCCTCCGCTAAGGGATAGCCAC  CCGCTATCTCTGACACGTTGCTCACTGAAACCTGCTACAAATAAGGCAGGC  ACCTCCCTAATCTCACACTCACTCAGTCAACAGCTCAACAGTGGTAACT  TTTACTCATCTCCTCCAAATATTTCTGATTTGATGATGTTTCCCTAGATT  CTATTAATGAATCGTGTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCA  TCTATTCTGATTTTGAATCTCTGCTACTGATTTGACCCCTACTGTAATC  GGTGATAAATGTAATGCTTCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCAGAAATCAAT  TTCTGTTTGTTTTGTTCATCTGTAGCTTGGTAGATTCCTTTTGTAG  ACCCACATCACGGATCCCCAACATAATTTGTAAGTGAATTTATTTCTGAA  TAACAATTCATGAATCAAGCAACAAGCTGATTTCAACATGAAAAAAC  AGAACAAAGAAAACGAAAACAGAGCATCATCCATCAAAGTGTAAATCTCAGCA  GATTT</p>
<p>41</p>	<p>Fragmento de la guía de gen de fosforilasa</p>	<p>GAGGGGGAAGTGAATGAAAAATAACAAAGGCACAGTAAGTAGTTTCTCTTT  TTATCATGTGATGAAAGTATATAATGTATGFTAGAGGATGATGTTATTA  CCACATAATAAGAGATGAGAGTCTCATTCTCTGCTT</p>

42	ADN de transferencia de pSIM870 (Russet Boise IV)	<p>TGCGAGGATATATACCGGTGTAACGAGGTGTGTGGTTGATCCAAATC TATCGTACCTTTAGAAAGTGTAGCTATGAAGGATAGTCTCACTTATGAAGA ACTACCTATTGAGATTCTTGTATCGTCAGGTCCGAAGGTGAGAAAATAGA AGTCCGCTTACGTTACGGCTTTGTGGAGGAGTAAGGGTACC GAACCATGCA CTCAATCTTAACTAATAAAATGCAACAAAATCTAGTGGAGGGACCGATA CCAGTACATFAGATATATCTTTATTAATTAATAAATTTTAAATFAGA CGAGCATAGGATGTCAAGTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAAGTT TTTAGATACTAGGAGCAGAACCGGAGGGGCCCATGCAAGGCCAAGTTG AAGTCCAGCCCTGAATCAACAAAGAGAGGGGCCCAATAACTGTCTGATGAGC ATTTCCCTATAAATACAGTGTCCACAGTGGCTTCCGCTAAGGGATAGCCAC CCGCTATCTCTGACACGTGTCACTGAAACCTGCTACAAATFAGGAGGC ACCTCCTCATCTCACACTCACTCACTCACACAGCTCAACAGTGGTAACT TTTACTCATCTCCFCAATFATTTCTGATTTTCATGCATGTTCCCTACATF CTATTATGAATCGTGTATGGTATAAACCCTGTTTCATATCTCATCTCA TCTATTCTGATTTTGAATCTCTGCTACTGAAATFAGCCCTACTGFAATC GGTGATAAATFAGATGCTTCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT TTCTGTTTTGTTTTGTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT ACCCACATCACGGATCCCAACATAAATGTAACGATGATTTATCTTGAA TAACAACTTCAATGAATCAAGCACAAAGCTGATTTCAAGTGAABAAAC AGAACAAGAAAACGAAAACAGAGCATCATCAATCAAGTGAATCTCAGCA GATTCAAATGAGACTAACTCGAGGTGCTCTCTATGCAAACTAGCTTTTCG AATGAGAGTGAAGAGAGTGAAGGATTTGTAATTTTATTGATGAAGAT TGGAGAAGTCAATFATGATTCAACACAGGAATTAAGTGTGTGTTGTTGTC GTCCCTTGTGGAAATTAATGTCCCTTTTATTTATCAATAAAGG ACGAAAATCTCTGCACTACTCCCTGCACTCTCTATATTTGTCATTTCC CCCAAACTCCCTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT TGAGACTCTGATCTTATTAATGTTGTAATAAGATGATCTCTTACAGAT ACATTAATACCTTCACTCACTGATAAAGAGAGAACTACTTACTGTGCTT TGTATTCTTCACTTCTCCCTTCCCGGGGTAAATTCATGATTTTA TGAATCAATAGCTTTTCAATGAGCAATATATCTTTCTTCTGATAGCA ATCCACATGCTCTTATGCTGCTGAAATAGTTTGGCCGTGGAGTTTCCAC ATCTATGTTTACAAATGATTTCTTGTAGCTGAGGAGGGGAGTGAATGAA AAATAACAAGGCACAGTAAGTAGTTCTCTTTTATCAATGATGAAGT ATATAATGATCTGTAGAGGATGATTTATTAACCATATAAAGAGATGA AGATCTCATTTCTGCTTAAAGCTTGAATGTTGGGTAAATTAAGTATGG ATTTGTTGGAAATGACAAAATTAAGAGAGTGGAGGGAGTAGTGCAGGA ATTTTCTGCTTTTATGATAAATAAAGGGTGAATTTAATTTCCCA</p> <p>CAGGAGGACGCAACACACTTAATTCCTGTGTGTAATCAATATTTG ACTCTCCAATCTCATCAATAAATAAATTCACAACTCCACTCTCTATC ACTCTCAATCGAAAAGCTAGATTTGATAGAGAGCCCTCAGATFAGTCTC TATTGAACTGCTGAGATFACACTTGTATGGATGATGCTCTGTTTTGTTT TCTTGTCTGTTTTTCTATGTTGAAATCAGCTTGTGCTGATTTTCTGAT AAGTTGTTATTCAGAAATAAATCAGTTACAATFATGTTTGGGTCTAGAGT ATGTGTTGCTAACAAGGGGAAATCTCAAGCTCAGATGAACAAAAC AAAACAGAAATGATTTCTGGAAGAAGAAGAAGAAGAGGAGCATTCCACA TTTATGACCGATFACAGTAGGTTCAATTCAGTAGGCAAGAAATCAAAAT CAGAATAGATGAGATGAGATATGAAACACAGTTTATAACCAATACAGAT TCATAATAGAAATGAGGAAACATGCAATGAAATCAAGAAATTAATGGAGG ATGAGTAAAGTTTCACTTGTGAGCTGTGATGAGTGAATGAGTGAAG TGGAGGTTGCTGCTTATTTGATGAGGTTTCAATGACAGGTTGCAAGA GAATAGCGGTTGGCTATCCCTAGCGGAAGGCACCTGTGACACTGATTA TAGGAAATGCTCATGCACTTTTATGAGGCTCTCTTTGTTGATTTCAAG CTGGACTCAACTGSSCTTGCATGSSCCCTCGGTTCTGTCTCCTA GTATCAAAAACATGAACTCACTCCCTTACCGCTACCACTGACATCTC TGTGCTCTGTTAAATTAATAATTAATTAATGATAAATAAATAAATAA ATGATCTGCTTCTGCTTCTGCTTCTGCTTCTGCTTCTGCTTCTGCTTCT AAGATGAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT TCAATGATAAGTATTTACTGATATTCGTTGTTTACTCAAGTAAATGAT CAACACATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT TFACTGAACTGCGGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA GTCAACATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT TTGAAACCAATTAAGAAAGAGTATGAGGATGATGATGATGATGATGATGAT ACTGGTAAATGAGGAGGATGAAATTTGATGCTTCAATTAAGCATGCA ACATGGGCTTTAGTCACTCACTTATGTTAATAATTAATTTCTGAACT GATACCAACTTCTTGGGAAAGTGAAGGATGATGATGATGATGATGATGAT CAATCTGGCAATTCGAATTAATCAAACTCTCTTTGCTCATTTCAATTC TCCCTATGCTGCAAGTCACTTATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA AGAAATTTATTTCTCACTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT CGTCTGCTACTCTTTTATTTCTCTCAAGGCAATGATGATGATGATGATGAT TTTAAATCAAAAATCTFGATTAACAATTCAGTTTCTCACTAATTAATTA CMTTAAATCATCAAGGTTTATACATCACTCGTCACTCTTTTATTTCTCT CAAGGCAATGATCATACCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT CAATTCATTTCTCACTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA GCTCCCACTCTTTTATTTCTCTCAAGGCTATGATGATGATGATGATGAT TCTGCAACAAAGTGAATGAGGTTCACTTAATTAATTAATTAATTAATTA TGTTCAAGTTAATTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA TTATTTGTTTAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA TTATTTTGAABAATAACCTTCTCAACAAATTAATTAATTAATTAATTA TTTTGCAAAAATAAGATTTAATTAATTAATTAATTTCTCATCATAGAT TTTTTFRAGCTAAGTACAAAATGATTTTCAATCCCAAAAATGAGCTCA ATCAAGAAATGCTTAAATCCCAAAAATGAGCTTCAATCAAGAGCTGTG TACCATCATACCTATGCTCTCTCTGTAATTCGCAAAAATCAGGCTTAT AAGTTACCTTGAATCAGATTAATAAATTAATTAATTAATTAATTAATTA CAAGGCAATCACTCTACCAAGCTCTAGTGAAGAGATCAGTTGAT ACAGGCTTGTAAAGGATCAAAATCTTATGTTAACAATAAATTAATTA ACAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA ATATCAAGGCAAAAAGAAAGATGATGAAAGAAATTAATTAATTAATTA GAGGTTACAACTCAACTCCCAATAAATCCAAAATAAATTAATTAATTA AAAACATCAATCAATTTCTCTACTTCAAGGCTTCAAGGCTTCAAGGCT CTCAACTTCCCAAGTGAATCCGATCAAAATCAACCCCAAACTTCT TCAAACTGCAAGCTCACTCTTTTCTCTATTAATTAATTAATTAATTA GTGCTCCCGGGTAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA ATGAGCAATTAATTTCTCTCAAGTCAAAATCAACATGCTTATGCTG</p>
----	---	---



		<p>CTGAAATAGTITTTGGCCGTGGAGTTTCACCATGTATGTTTACAAATGATC  TTGTAGCTGCAGGACACGTATATTTTATTTGTAATATACAGAAAAAGAG  TGAGTGTGCGAGTTTGGAGAGGGTTACGGTGGTGAATTTGTTATGGGATGT  CACGTGGGAAAGTTTGGAGTGCAGCCGGCGTGGCCCGTGAAGTAGAGCA  ATTTGATTTGGATGTTTTTGCATTTGAATGTTTTATTTTGGAGTTTTATGG  GAGTTTGAATGTAACCTCTTCTTTTCTTTGATATTTCTTTTCATGATCTT  TCTTTTGCCTTTGATATTTCTTTGCAATAGTACTTTACTCTTACTCTCTGG  TTAACTGAATTAATTTGTCICATTTATTTGGTTAAACATAAGAAATTTTCT  AGAGTGATCTGTGCTCAGAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGAAC  AAAAACAAAACAGAAATGATTTCTGAGAGAAAGAAAGAGAGAGAGAGCA  TTCACATTTATCACCGATFACAGTAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAT  CAAATCAGAAATAGATGAGATGAGATATGAACAACGTTTATACACCATAA  CACGATTCATAATAGAAATGAGGGAAACATGCATGAAATCAGAAATAATTTG  GAGGAGATGAGTAAAAGTTACCACTTGTGGAGCTGTGTGAGTGAAGTGGT  TGAGAAATGAGGAGGTGCCTGCCTTATTTGTAGCAGGTTTCAGTGACACGTG  TCAGAGAAATAGCGGGTGGCTATCCCTTAGCGGAAGGCAACTGTGGACACT  GTATTTAGGGAAATGCTCATCGACAGTATTTGGCCCTCTCTTTGTTGA  TTCAGGGCTGGACTTCAACTTGGGCCCTGCATGGGCCCTCCGGTCTCTGT  CTCCTAGTATCTAAAAAAGTGAACCAACTCCCTCCACCGCTACCACTTGA  CATTCCTATGTCFCGTGTTAAATTAATAATTTATTAAGTAATAAAGATAA  TATCTAATGACTGAGTACTGGTCCCTCCACTAGAAATTTGTTGCAATTTTT  AGTATTAAGATTGGAGTGCATGGTTCGAGCTCCTTCAACATGTTATAACT  TCACATATTCAGTTGGAAATAGGCTTTATAATGAGTTGGACTACGTTATGT  CCCCCTCAAGTCCCAGAAATATGTGCCCCCGTATGTTAAGTCCCGCTCG  CGGCATCAATTTAGTGAATCAGCCAGACATGCCCTATACCTCGGCCAGG  ATATATTTGTTGGTAATG</p>
43	Intrón R1	<p>GTAAATTTCTAGTGATTATACTGTACATTTGCGATAAATTTAGGATCGTATT  TGATATGTTTTAGGCTTGAATGATCGAGAACTTAAAGCTTTTCTGATCTGA  AAATTTGTTTTTGGCATACTCGAGTGGAGATCCGTTAAATCAGTGTAT  TTGATTTGAATTTAGCAAAATTTGGTGTGATTTTCAGTATTTTCATGGT  TTAATGTATATAAACAAGCTTAAATTTTCAAATCAAGCTCGTTAAACCTT  TTAATFACAGCATATTTCTGGAAAAAGTTGGTGAATTTCTCTAGATGTT  TATTCGAGAAAAAACAACAAAGGAAAGGGAAATGCTGTCTGTATGT  ACAATAAGTGAATGATCAGCTTTTGGTCACCGACATACATTTGATTAGTAC  ATAACAGTGCATACAGATATATTTCCGTGTGCATTTATTTGTTGAAAGG  AATTCGGATTTGGTTGATTCCTTTTAAACTTCTAAGTTTTTTTGTATA  CATTTTACTCTAATTAAGTCTTCTCTGTGAATGACAAATACTCACCGGC  ACACATFACAACCTTCATTTGATFATCCGGAACGATCCATTTGCTTTGTG  IATATTTGCTTTTGTATGACTGATTTGTATTGATTTAGCAG</p>
44	St02 de frontera de patata	CATTACCAACAAATATATCCTGGCC
45	Le01 de frontera de tomate	CATTACCAACAAATATATCCTGGCC
46	Frontera de tomate	CTCTACCTCTGAATATATCCTGCGG
47	ca01 frontera de pimienta	CATTACCAACAAATATATCCTGGCC
48	Ns01 de frontera de alfalfa	GTATACCTCTGTATACATCCTGCCG
49	Hv01 de frontera de cebada	ATATACCAAATGATACATCCTGCC
50	Os01 de frontera de arroz	ACTTACTCAAGGATATATCCTGGCT
51	Fragmento central de 300-bp de promotor P1	<p>GCCTCAACAAGGTCAGGGTACAGAGTCTCCAAACCAATAGCCAAAAGCTAC  AGGAGATCAATGAAGAACTTTCATCAARGTAAACTACTGTTCCAGCACAT  GCATCATGTTGAGTAAAGTTTCAGAAAAAGACATCCACCGAAGACTTAAAGT  TAGTGGGCATCTTTGAAAAGTAACTTTGTCACATCCAGCAGCTGGCTTGTG  GGGACCGACAAAAAAGGAATGGTGCAGAAATTTTAGGCCACCTTACCAA  AGCATCTTTGCCCTTTATTTGCAAGATAAAGCAGATTCCTCTAGTA</p>
52	Fragmento de gen Comt	<p>AATGCCCCCAATCAAGGACTGCATCTTTAGGTGGTACCAGCTTTCCATGAG  CACTTTATCCTGATTCATGAGATTAAGAGCAGAAATGGATACACCATCTTC  ATTCTTAAACCAATACCTAGCAACAGTAGCCAAACCAATAAAGTCTCTGAAC  CTTTCCATCTTTGTTGAGTACGAACTGAACAAGTGAAGATATTGTAACAAGC  CAAGAGACGCAACATTCGGTCCAACATAACTGGTGCATCAGGGTTAGTTGT  TGGTAGCTGAGAAAGCAATTTCAATAGGTCAAATTTGAGCACCAGGCTCCA</p>
53	Fragmento de gen Comt	<p>AATGCCCCCAATCAAGGACTGCATCTTTAGGTGGTACCAGCTTTCCATGAG  CACTTTATCCTGATTCATGAGATTAAGAGCAGAAATGGATACACCATCTTC  ATTCTTAAACCAATACCTAGCAACAGTAGCCAAACCAATAAAGTCTCTGAAC  CTTTCCATCTTTGTTGAGTACGAACTGAACAAGTGAAGATATTGTAACAAGC  CAAGAGACGCAACATTCGGTCCAACATAACTGGTGCATCAGGGTTAGTTGT  TGGTAGCTGAGAAAGCAATTTCAATAGGTCAAATTTGAGCACCAGGCTCCAGA  ATTCATCTCACAAAACCTCATCAATCACAAACCAATGGGTTCAACAGGTTGA  AACTCAAATAACACCACCAATATCAGATGAGAAAGCAACCTCTTCCG  CATGCAACTAGCAAGTCTTCAAGTCTTCCCATGATTTTGAATCAGCTCT  TGAACCTTGTCTTTAGAAATCATTGCTAAAGC</p>

<p>54</p>	<p>Promotor de alfalfa</p>	<p>GGGCCCATAGTGGACCAGTTAGGTAGGTGGAGAAAGAAATTTAAAAAAA  TATATTTATATGTGTCAAAFAACTCAAAAATCATAAAAGTTAAGTTAGC  AAGCTGACACATTTTATTTGGACAAAAGTATTCACCTACTACTGTATAA  ATCATTATTAACATTTAGAGTAAGAATAATGGATGATAAGAAATAGAGTA  GTGATATTTTGACAAACAAFTTGTTCACACATTTGAGAAAATTTTGTGTT  CTCTCTTTTCATTTGGTCAAAAACAATAGGAGAGAGAGAGAAAAGGAAGA  GGGAGAAATAAAAACATTAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTT  GTACCAAAAATGGTTGTACAAAATCATTTGAGGAATTTGACAAAAGCTACAC  AAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATG  TACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAAAAGAAAGAAATAAATTTT  TTAAATTAAGAAGTTGAGTCATTTGATTAACAATGATGATTTTAAATGAAT  TGATGAGAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAAATGATTAAGAATTTGGTGTCAA  ATTTAATTTGACATTTGATCTTTCCCTATATATGCCCCATAGAGTCATTT  AACTCATTTTATATTTTCAATAGATCAAAATAAGAGAAATAACGGTATATTA  TCCCTCCAACAAAAAABAAAAAABAAAAAABAAAAAABAAAAAABAAAAA  CCAGCTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCGTGATGAG  ATAACCCACTTTAAGCCACGCCTCTGTGGCAGATCTACATTTCTAAAT  CACACATTTCTCCACACATCTGAGCCACACAAAACCAATCCACATCTTA  TCATCCATTTCTAFAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTGTATCCCT  TCAACACATACAAAAGAGAAAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGA  GAAAGCC</p>
<p>55</p>	<p>Promotor de alfalfa</p>	<p>AGAGAGGAGGCAGTGTACACAGGGGCAGAGAGAGGTTGAGTCTGCTTTCTGG  TAGGGCTGGTGTGGGGATAGTGGTTGGTTTGAGAGTCAGGTGGTGGAGG  GGTTGGCGATGGGGTTGATACGTTGTTTGGTTGGATAGGTTGGTTAGGAGA  TGCTCCTTTTGTGTTTGTTCAGGAGGTTGTTGACTTAACAGAGAACAA  ATTTGCTCTGTGGCTAATTTGTTATCTGTGACTCGGAGCAGTGGGGGA  GGTGTGAGGTGAAGCGTATGGTGGCAGAGGTTGGCAGAGGTTAAGAGGT  ATGTTGGCAGCTGAGGGAGCAGTGTACACAGAGGTTGAGAGAGAGGAGAG  AGAGAGAGAGAGAGAGAGAAATGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  ACAAAATTTTGTGTGTGTGACCAACCAAAAATTTCTGGTCTGGTCCACAC  AGATTTTCTCCCAACCAAGGTACAGAAATACCCAGATCCAAAGATGCCAC  GTTGCCAATCAATAACCGTTCAATAGTAAGAGATAATCGAAGCGGCAFAAT  TAATTTTCAACAAACCCACTTTTTCCTACTTTTGGCACTTGTGCCCTC  ATCACCTACCAAAACACATAGCACACCAACACACATAAATAATATATAAT  AATFGTAAATATATGTAGCCCTCCAAATAGAAAGAAACCTCTATATAAAGC  CTAACTACTTCTTCAAAAATCAGGAAATTCACAACCTAATAATTCATTTT  TTTCTAATCATTAGAATTTCCATTTCTTATAAAATTTCTAGGTACCACCACA  CAACAAATAAAGGAACATTAACTCAATACTATTAAGAT</p>
<p>56</p>	<p>Fragmento de ADN de alfalfa que funciona como alternativa a la frontera izquierda de Agrobacterium</p>	<p>CGGCAGGATGTATACAGAGGTATCAATTTTATATTACATTTATATTTGTG  TTAATTCATTAATTTTCACTTTTATTTTACTTTGATAATCAACTGTGT  AAAGAATTTATTTGAAAAATATATAATTTATAGAAATTTTTTTTGTATAG</p>
<p>57</p>	<p>Fragmento de ADN de alfalfa que funciona como alternativa a la frontera derecha de Agrobacterium</p>	<p>CTAGATTATGGGGCTAACGGGCTGCCCGCGGCCCTTTGCGGCTAGCCCTA  ACGGGTACCGGGCCCGGCAGGATGTATACAGAGGTATAC</p>
<p>58</p>	<p>ADN de transferencia completo de pSIM856</p>	<p>GGCAGGATGTATACAGAGGTATCAATTTTATATTACATTTATATTTGTG  TTAATTCATTTGAATTTTCACTTTTATTTTACTTTGATAATCAACTGTGT  AAAGARTTATTTGAAAAATATATAATTTATAGAAATTTTTTTTGTATAG  GGGCCATAGTGGACAGTTAGGTAGGTGGAGAAAGAAATTTTAAAAAAA  TATAATTAATATGTTGCAAAATAACTCAAAAATCATAAAAGTTAAGTTAGC  AAGTGTGCACATTTTATTTGGACAAAAGTATTCACCTACTACTGTTATAA  ATCATTTAATCAATTAGAGTAAGAATAATGGATGATAAGAAATAAGAGTA  GTGATTTTGGACAAATTTTGTTCACAACTTTGAGAAAATTTGTGTT  CTCTCTTTTCATTTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAGAGAGAAAAGGAGAG  GGGAAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTT  GTACCAAAAATGGTTGTACAAAATCATTTGAGGAATTTGACAAAAGCTACAC  AAATBAGGGTTAATGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATG  TACCATTAGAGAAATTTTGGCAAGTCATTAAAAGAAAGAAATAAATTAATTT  TTAAAATTAAGAAGTTGAGTCATTTGATTAACAATGATGATTTAATGAAT  TGATGAGAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAAATGATTAAGAATTTGGTGTCAA  ATTTAATTTGACATTTGATCTTTCCCTATATATGCCCCATAGAGTCATTT  AACTCATTTTATATTTTATAGATCAAAATAAGAGAAATAACGGTATATTA  TCCCTCCAACAAAAAABAAAAAABAAAAAABAAAAAABAAAAAABAAAAA  CCAGCTAGGAGGATAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAG  ATAACCCACTTTAAGCCACGCCTCTGTGGCAGATCTACATTAATCAAT  CACACATTTCTCCACAGATCTGAGCCACACAAAACCAATCCACATCTTTA  TCATCCATTTCTAFAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTTCCCT  TCAAACACATACAAAAGAGAAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGA  GHAAGCCCTGCAGAAATGCCCAATCAGGACTGCTCTTTTGGTGGTACC  AGCTTCCCTGAGGACTTTATTCCTGATTCATGAGATTAAGAGCAGAAAATGG</p>

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un constructo de transformación de plantas, que comprende al menos dos copias de un polinucleótido deseado que están orientadas como una repetición invertida y que están enlazadas operativamente a y flanqueadas por elementos reguladores, en donde el polinucleótido deseado comprende una secuencia del promotor de un gen objetivo pero ninguna secuencia localizada corriente abajo del inicio de la transcripción del gen objetivo y
- en donde los elementos reguladores son dos promotores de plantas funcionales orientados para inducir la transcripción convergente de las dos copias del polinucleótido deseado, y
- en donde el polinucleótido deseado comparte identidad de secuencia hasta al menos 24 oligonucleótidos contiguos de la secuencia promotora del gen objetivo.
- 10 2. El constructo de transformación de planta de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un espaciador posicionado entre las dos copias del polinucleótido deseado.
3. El constructo de transformación de planta de la reivindicación 1 o 2, en donde el promotor de planta funcional es un promotor específico de tejido.
- 15 4. El constructo de transformación de planta de la reivindicación 3, en donde el promotor de planta funcional es específico para un tejido de planta seleccionado de un tubérculo, una semilla, una fruta, una hoja, una raíz, un sistema vascular, una flor, polen y un óvulo.
5. El constructo de transformación de planta de la reivindicación 3 o 4, en donde el promotor funcional específico de tejido es seleccionado de un promotor de sintasa de almidón de enlazamiento de gránulos y un promotor de ADP glucosa pirofosforilasa.
- 20 6. El constructo de transformación de planta de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el gen objetivo es seleccionado de un gen COMT involucrado en la biosíntesis de la lignina, un gen CCOMT involucrado en la biosíntesis de la lignina, cualquier otro gen involucrado en la biosíntesis de la lignina, un gen R1 involucrado en la fosforilación de almidón, un gen fosforilasa-L involucrado en la fosforilación del almidón, un gen PPO involucrado en la oxidación de polifenoles, un gen de poligalacturonasa involucrada en la degradación de la pectina, un gen involucrado en la producción de alérgenos, y un gen involucrado en la biosíntesis de ácidos grasos.
- 25 7. El constructo de transformación de planta de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el gen objetivo es PPO.
8. El constructo de transformación de planta de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el gen objetivo es R1.
- 30 9. El constructo de transformación de planta de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polinucleótido deseado comprende secuencias promotoras de múltiples genes objetivo.
10. El constructo de transformación de plantas de la reivindicación 9, en donde el polinucleótido deseado produce un transcrito que direcciona y reduce la expresión de un gen objetivo de polifenol oxidasa, un gen objetivo de fosforilasa L y un gen objetivo R1.
- 35 11. Un método para reducir la expresión de un gen objetivo en una célula vegetal, que comprende expresar el constructo de transformación de planta como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en una célula vegetal, en donde el nivel de expresión del gen objetivo es reducido en comparación con el nivel de expresión del gen objetivo en una célula vegetal no transformada.
- 40 12. El método de la reivindicación 11, que comprende adicionalmente obtener una planta a partir de la célula vegetal que expresa el constructo de transformación de planta.

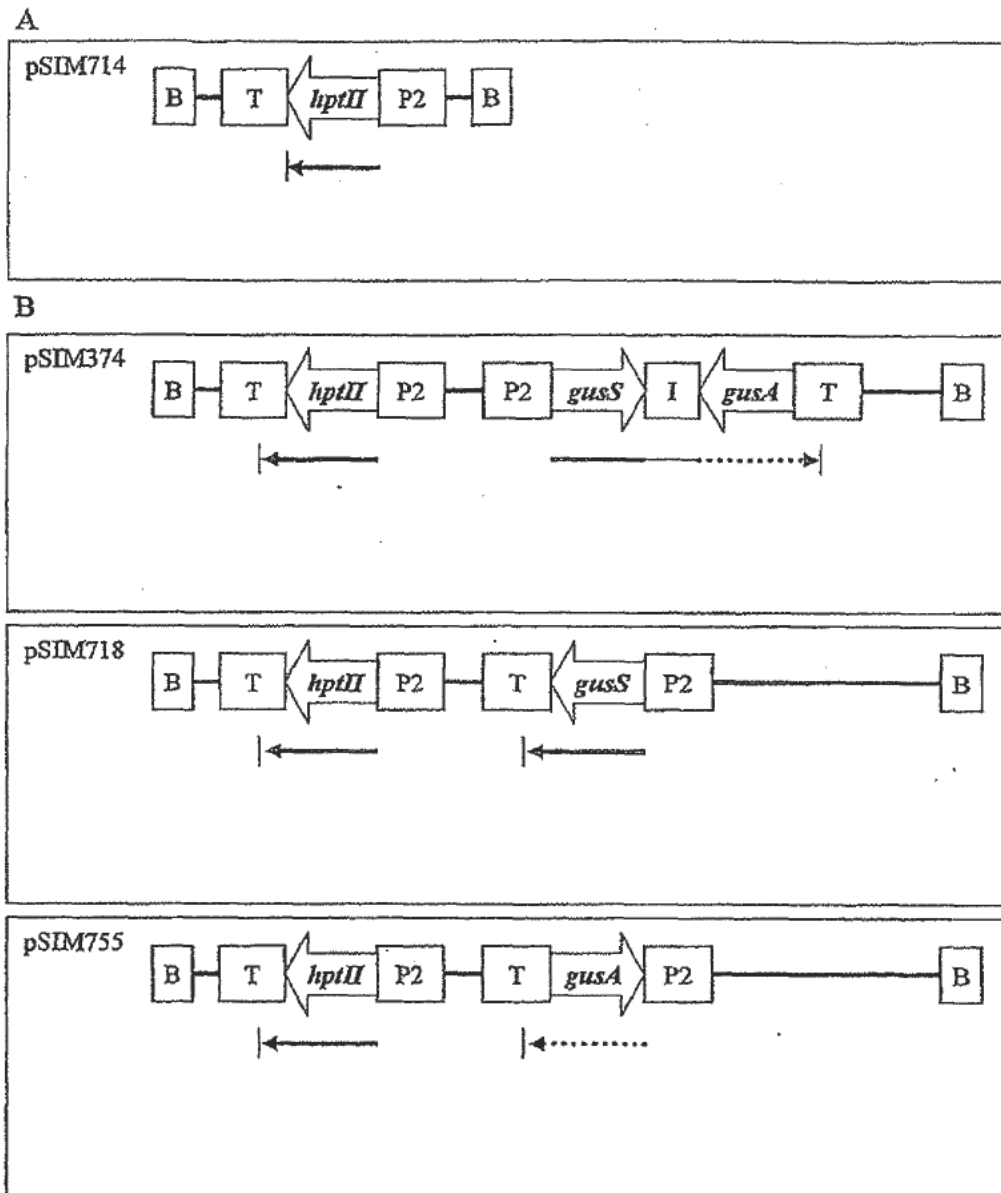


FIGURA 1

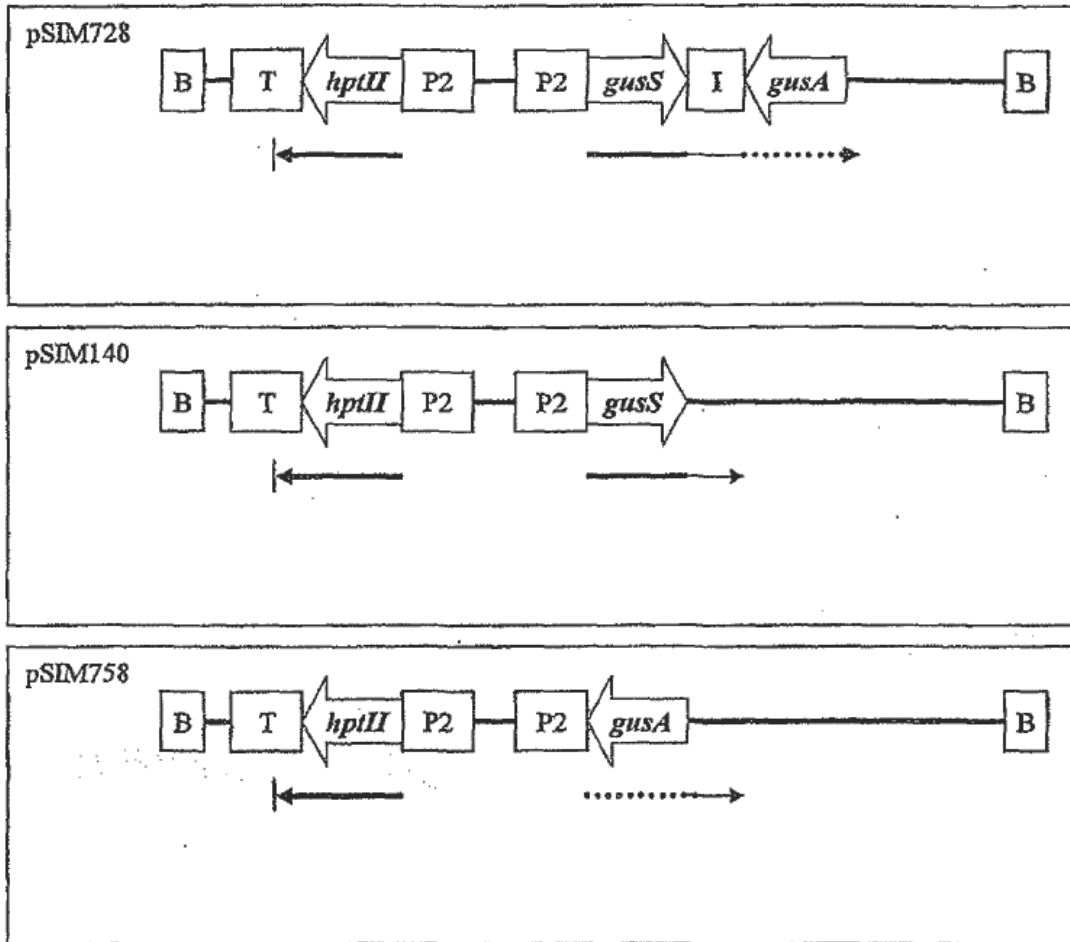


FIGURA 2

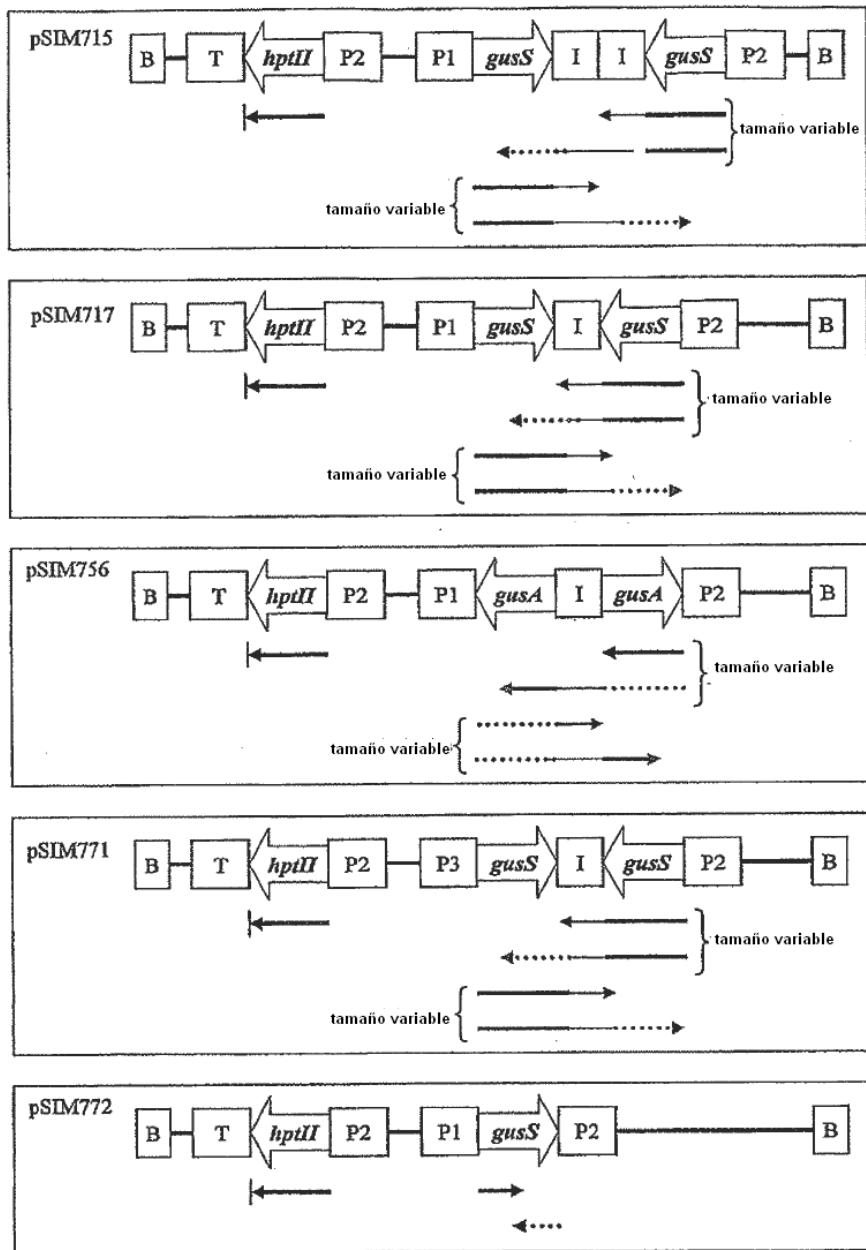


FIGURA 3

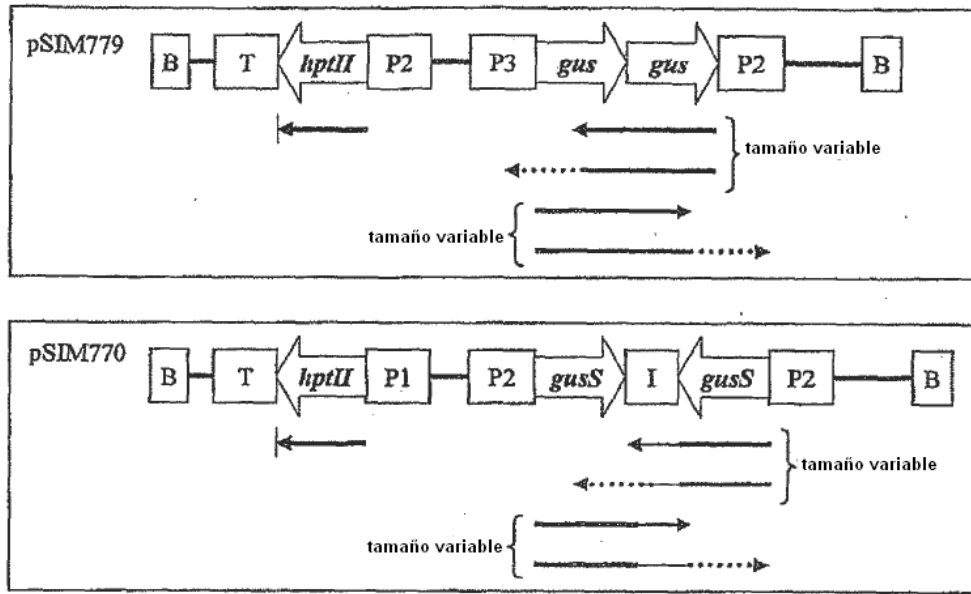


FIGURA 3 (CONTINUACIÓN)

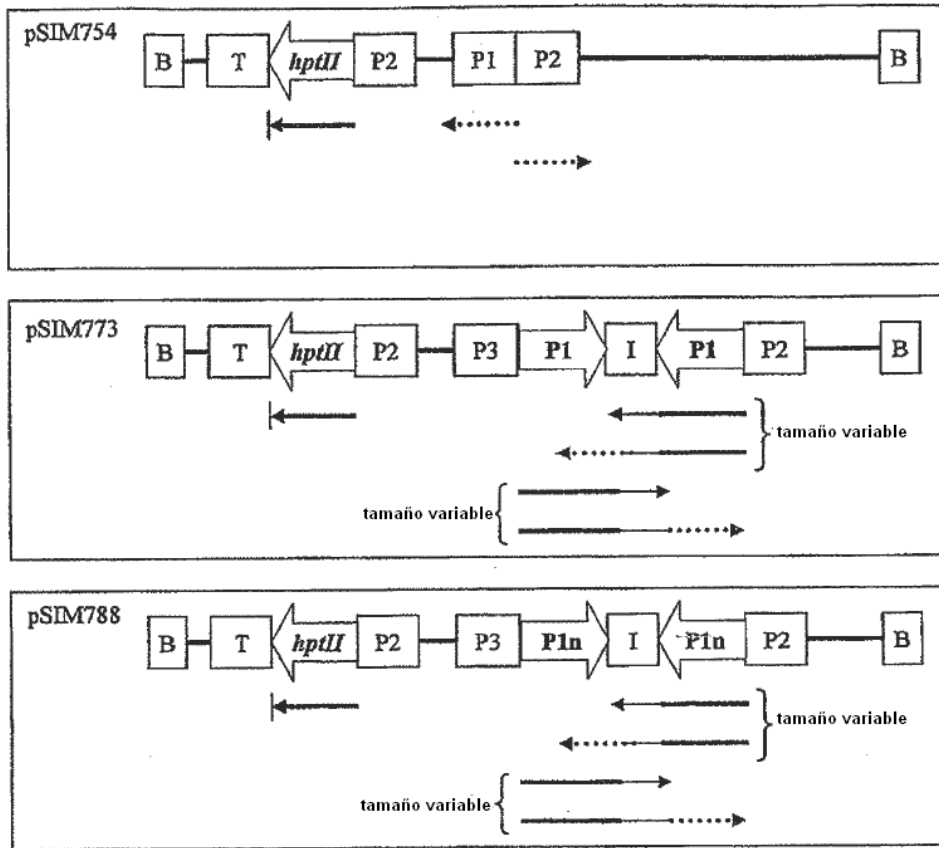


FIGURA 4



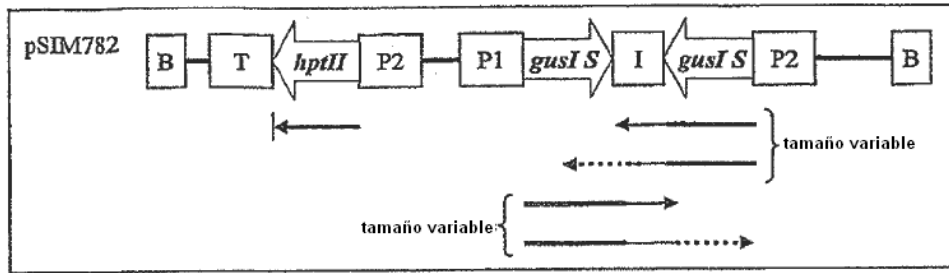


FIGURA 5

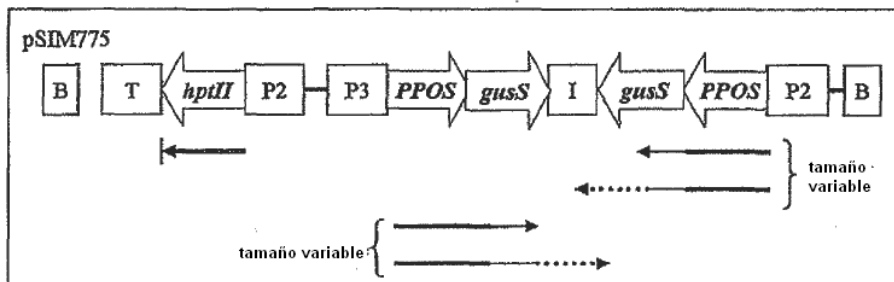
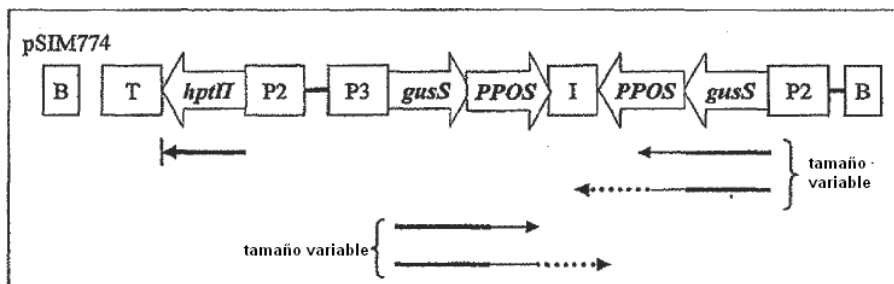
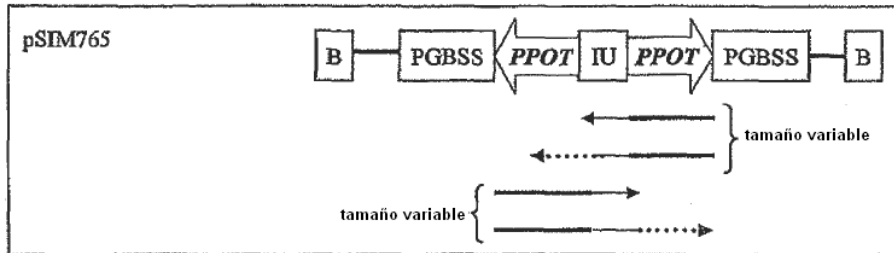
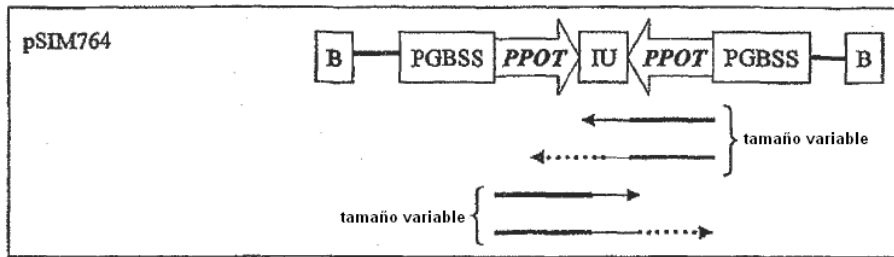


FIGURA 6

FIGURA 7

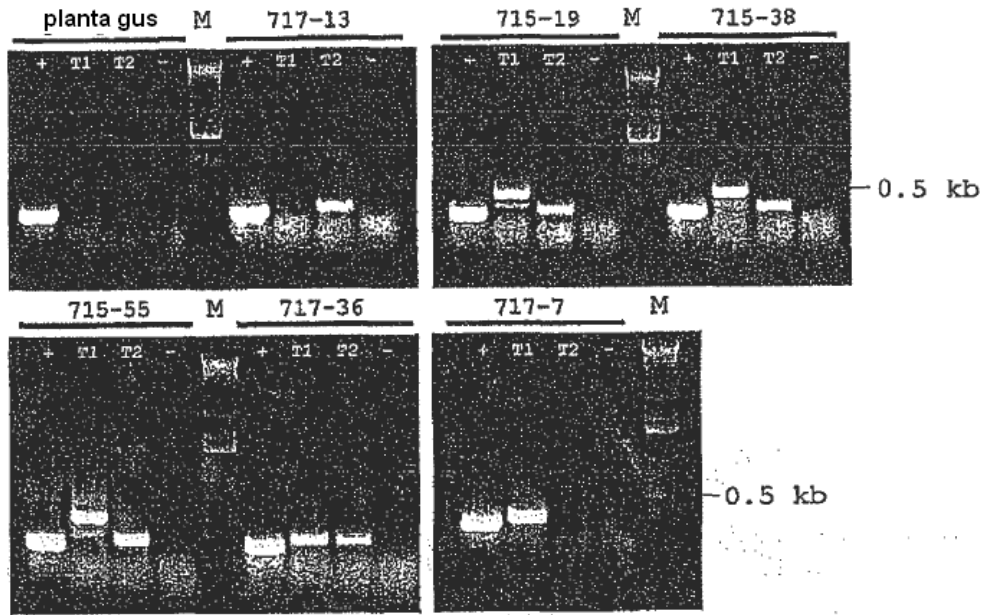
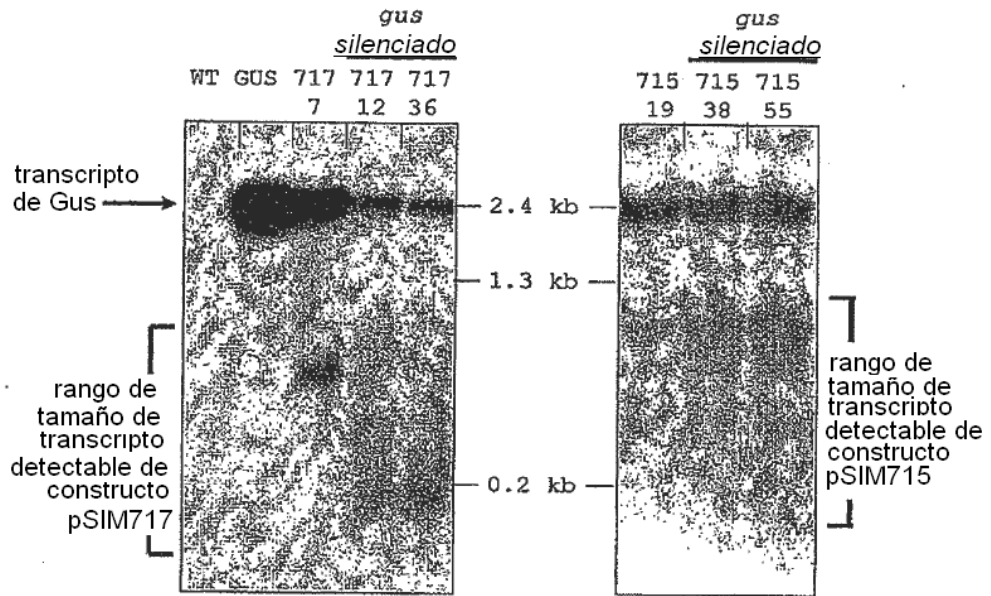


FIGURA 8



**Figura 9**

**Parte del promotor P1 que facilita el silenciamiento del gen**

CAAGTGGGGAACAAAATAACGTGGAAAAGAGCTGTCCTGACAGCCCACTCACTAATGCCGTATGACGAACGCAGTGAC  
GACCACAAAAGA (SEQ ID NO: 60)

FIGURA 10

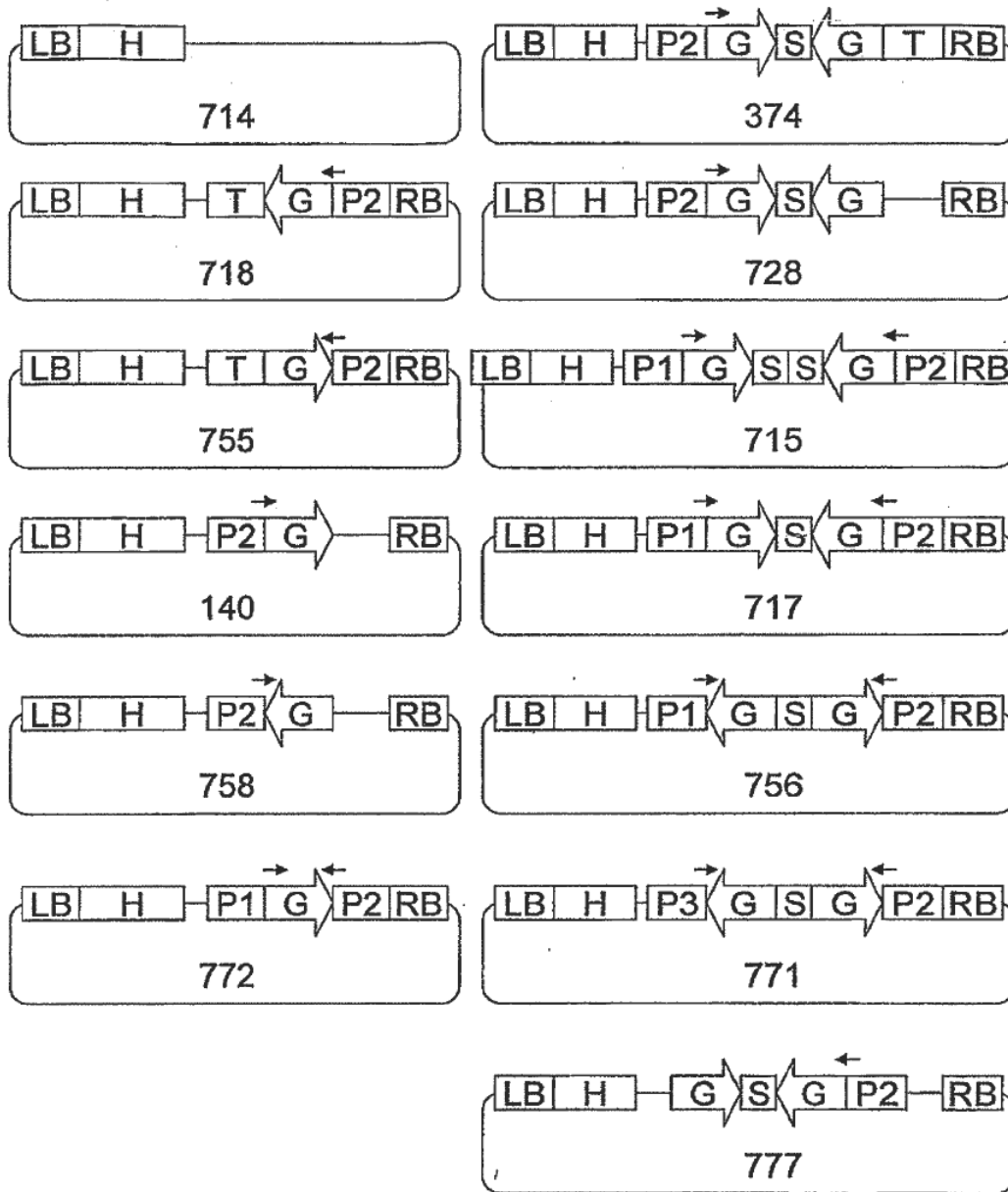


FIGURA 10 (CONTINUACIÓN)

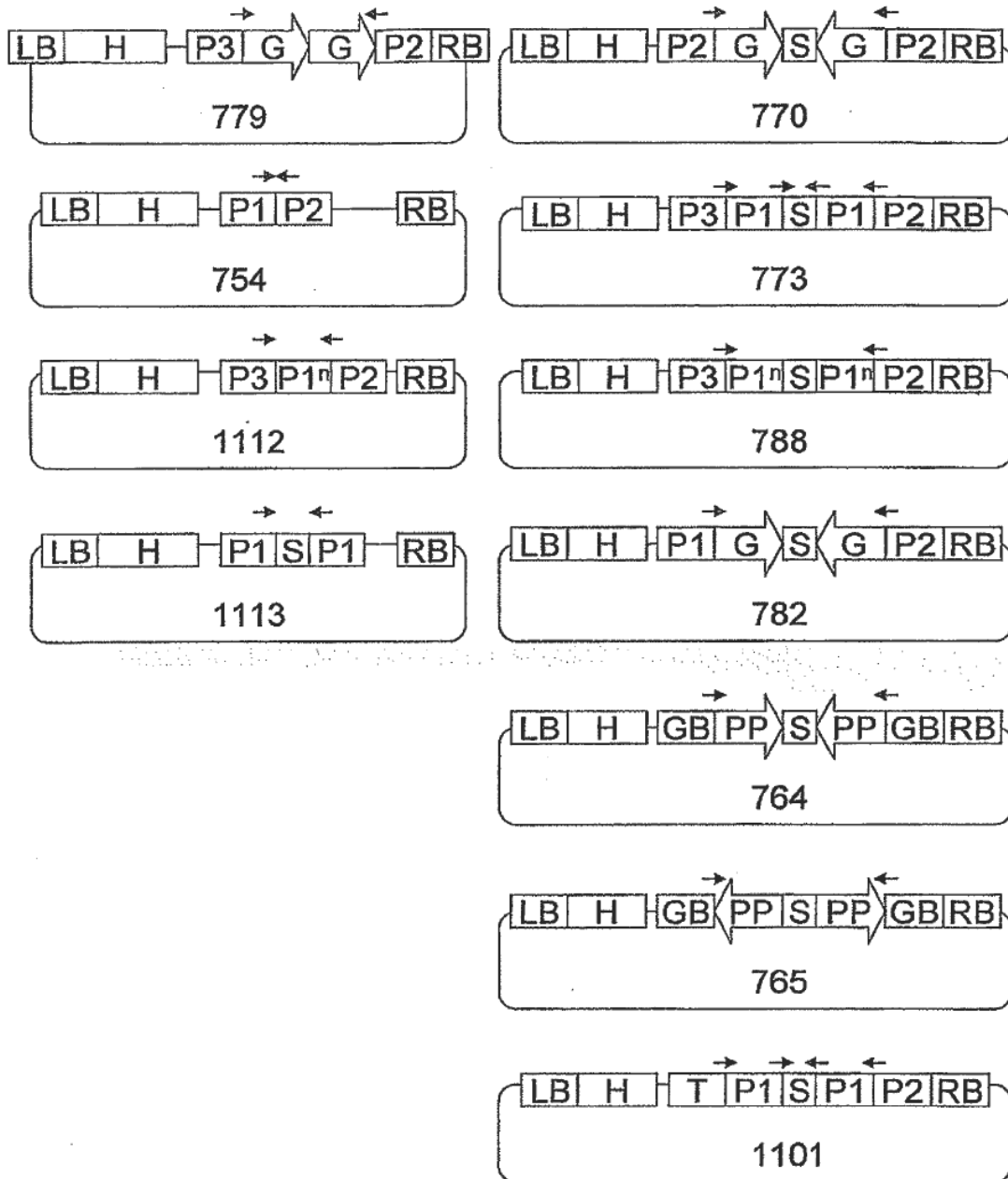


FIGURA 10 (CONTINUACIÓN)

