

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 426**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

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 05803305 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015** **EP 1799028**

54 Título: **Silenciamiento génico**

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:

22.04.2015

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 2 534 426 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 génico

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con constructos únicos para producir un producto de ácido nucleico que regula negativamente o previene la expresión de un polinucleótido objetivo deseado.

10 Antecedentes de la invención

La supresión de la expresión génica se puede lograr por constructos que desencadenan el silenciamiento génico postranscripcional o transcripcional. Estos mecanismos de silenciamiento pueden regular negativamente el polinucleótido deseado o la expresión génica por modificación de la cromatina, escisión de ARN, represión de la traducción, o a través de mecanismos desconocidos hasta la fecha, Ver Meister G. y Tuschl T., Nature, vol. 431, págs. 343-349, 2004.

Un constructo que se usa típicamente en este sentido contiene un polinucleótido deseado, que comparte identidad de secuencia con al menos parte de un gen objetivo que se enlaza operativamente a un promotor y un terminador. Como bien se aprecia, el promotor inicia la transcripción, mientras que el terminador termina la transcripción en un sitio específico y posteriormente media la poliadenilación. Tal procesamiento del transcrito es importante para la estabilidad del transcrito y su transporte a partir del núcleo y en el citoplasma.

En este sentido, el terminador desempeña un papel importante en los constructos de silenciamiento génico convencional. Por ejemplo, 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 complementaria inversa al gen objetivo y un terminador. Un terminador de constructos convencionales no necesariamente se tiene que posicionar inmediatamente corriente abajo del polinucleótido deseado. Por ejemplo, Mette y colaboradores describieron un plásmido que contiene un polinucleótido deseado que se separa de un terminador enlazado operativamente por un gen higromicina (Mette y otros, EMBO J 18:241-8,1999; Mette y otros, EMBO J 19: 5194-201, 2000).

Otros constructos convencionales diseñados para silenciar genes contienen un polinucleótido en la orientación sentido o antisentido entre promotor y terminador. Un constructo de silenciamiento génico convencional de ese tipo típicamente produce transcritos de ARN que son similares en tamaño, determinado por la distancia a partir del inicio de la transcripción al sitio de la escisión de la terminación y la cola poli-adenilada.

La presente invención se relaciona con nuevas estrategias y constructos para el silenciamiento génico que son generalmente más eficaces que los constructos convencionales. Además, la presente invención se relaciona con nuevas estrategias y constructos para el silenciamiento génico usando un polinucleótido que no se enlaza operativamente a un promotor y un terminador, pero en su lugar se enlaza operativamente a dos promotores convergentemente orientados.

40 Breve descripción de la invención

Las estrategias y constructos se pueden caracterizar por ciertas características. Un constructo, por ejemplo, puede no comprender una región de ADN, tal como un terminador, que se implica en la formación del extremo 3' y poliadenilación. Alternativamente, el constructo puede comprender un terminador no funcional que es naturalmente no funcional o que se ha modificado o mutado para volverse no funcional.

Un constructo se puede caracterizar además en el arreglo de los promotores en ambos lados de un polinucleótido deseado. De ahí que, un constructo puede comprender dos o más promotores que flanquean uno o más polinucleótidos deseados o que flanquean copias de un polinucleótido deseado, tal que se transcriben ambas cadenas del polinucleótido deseado. Es decir, un promotor se puede orientar para iniciar la transcripción del extremo 5' de un polinucleótido deseado, mientras que un segundo promotor se puede orientar operativamente para iniciar la transcripción a partir del extremo 3' del mismo polinucleótido deseado. Los promotores orientados de forma opuesta pueden flanquear múltiples copias del polinucleótido deseado. De ahí que, el "número de copia" puede variar de 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 número entero entre estos, de un polinucleótido deseado en última instancia flanqueado por promotores que se orientan para inducir la transcripción convergente.

Alternativamente, un primer promotor se puede enlazar operativamente a un primer polinucleótido en el "casete A," por ejemplo, y un segundo promotor se puede enlazar operativamente a un segundo polinucleótido, por ejemplo, "casete B." Los polinucleótidos de cada casete pueden o no pueden comprender la misma secuencia de nucleótidos, pero pueden compartir algún porcentaje de identidad de secuencia con un ácido nucleico objetivo de interés. Los casetes se pueden arreglar en forma de tandem, es decir, de manera que son adyacentes uno al otro en el constructo. Además, el casete B, por ejemplo, se puede orientar en la orientación complementaria inversa al casete A. En este arreglo, por lo tanto, la transcripción a partir del promotor del casete B procederá en la dirección hacia el promotor del casete A. De ahí que, los casetes se arreglan para inducir la "transcripción convergente."

Si ninguno de los dos casetes comprende una secuencia de terminador, después un constructo de ese tipo, en virtud del arreglo de transcripción convergente, puede producir transcritos de ARN que son de diferentes longitudes.

En esta situación, por lo tanto, pueden existir subpoblaciones de transcritos de ARN parcialmente o completamente transcritos que comprenden secuencias parciales o completas del polinucleótido transcrito deseado del casete respectivo. Alternativamente, en ausencia de un terminador funcional, la maquinaria de transcripción puede proceder más allá del final de un polinucleótido deseado para producir un transcrito que es más largo que la longitud del polinucleótido deseado.

En un constructo que comprende dos copias de un polinucleótido deseado, por lo tanto, donde uno de los polinucleótidos se puede o no puede orientar en la dirección complementaria inversa a la otra, y donde los polinucleótidos se enlazan operativamente a promotores para inducir la transcripción convergente, y no existe terminador funcional en el constructo, la maquinaria de transcripción que se inicia a partir de un polinucleótido deseado puede proceder hasta transcribir la otra copia del polinucleótido deseado y viceversa. Las copias múltiples del polinucleótido deseado se pueden orientar en varias permutaciones: en el caso donde dos copias del polinucleótido deseado están presentes en el constructo, las copias se pueden, por ejemplo, orientar por ejemplo tanto en la misma dirección, en la orientación inversa una a la otra, como en la orientación de complemento inverso una a la otra.

En un arreglo donde uno de los polinucleótidos deseados se orienta en la orientación complementaria inversa al otro polinucleótido, se puede producir un transcrito de ARN que comprende no sólo la secuencia "sentido" del primer polinucleótido, sino además la secuencia "antisentido" a partir del segundo polinucleótido. Si el primer y segundo polinucleótidos comprenden la misma o sustancialmente las mismas secuencias de ADN, el único transcrito de ARN puede comprender después dos regiones que son complementarias una a la otra y que pueden, por tanto, aparear. De ahí que, el único transcrito de ARN que así se transcribe, puede formar una estructura bicatenaria de horquilla parcial o completa.

Por otro lado, si se produjeron dos copias de un transcrito largo de ese tipo, uno a partir de cada promotor, existirán después dos moléculas de ARN, cada una de las cuales puede compartir regiones de complementariedad de secuencia con la otra. De ahí que, la región "sentido" del primer transcrito de ARN puede aparear con la región "antisentido" del segundo transcrito de ARN y viceversa. En este arreglo, por lo tanto, otro ARN bicatenario se puede formar que consistirá de dos transcritos de ARN separados, a diferencia de una horquilla bicatenaria que se forma a partir de un único transcrito de ARN autocomplementario.

Alternativamente, dos copias del polinucleótido deseado se pueden orientar en la misma dirección de manera que, en el caso de lectura completa de la transcripción, el transcrito de ARN largo que se produce a partir de un promotor puede comprender, por ejemplo, la secuencia sentido de la primera copia del polinucleótido deseado y además la secuencia sentido de la segunda copia del polinucleótido deseado. El transcrito de ARN que se produce a partir del otro promotor orientado de forma convergente, por lo tanto, puede comprender la secuencia antisentido de la segunda copia del polinucleótido deseado y además la secuencia antisentido del primer polinucleótido. En consecuencia, es probable que ningún transcrito de ARN pueda contener regiones de complementariedad exacta y, por lo tanto, ningún transcrito de ARN es probable que se pliegue sobre sí mismo para producir una estructura de horquilla. Por otro lado los dos transcritos de ARN individuales podrían hibridar y aparear el uno al otro para formar un ARN bicatenario.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona 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 ni el primer ni el segundo polinucleótido se enlaza operativamente a un terminador, en donde dicho constructo produce moléculas de ácido nucleico que previenen o reducen la expresión de un gen o de un producto génico y en donde (a) el primer polinucleótido comprende una secuencia de al menos 23 nucleótidos contiguos que comparte identidad de secuencia con un gen objetivo un elemento regulador que se asocia con el gen objetivo, un exón del gen objetivo, un intrón del gen objetivo, una región no traducida 5' del gen objetivo y/o la región no

traducida 3' del gen objetivo, (b) el segundo polinucleótido se orienta como una copia de repetición invertida del primer polinucleótido, y (c) el primer promotor y el segundo promotor se orientan para introducir la transcripción convergente del primer polinucleótido y el segundo polinucleótido.

5 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un plásmido de transformación que comprende el constructo de la reivindicación 1, en donde el plásmido de transformación comprende un casete de expresión, que comprende en la orientación 5' a 3' (1) un primer promotor que se enlaza operativamente a (2) un primer polinucleótido deseado, que está contiguo a (3) al menos un polinucleótido separador opcional, donde el extremo 3' de uno de los polinucleótido separadores está contiguo a (4) un segundo polinucleótido deseado, que se enlaza operativamente a (5) un segundo promotor, en donde
10 ningún polinucleótido deseado en el casete de expresión se enlaza operativamente a cualquier terminador de transcripción, en donde dicho constructo produce moléculas de ácido nucleico que previenen o reducen la expresión de un gen o de un producto génico, y en donde el segundo polinucleótido deseado se orienta como un complemento inverso del primer polinucleótido deseado.

15 En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un método para reducir la expresión de un gen normalmente capaz de ser expresado en una célula de la planta, que comprende exponer una célula de la planta al constructo de la reivindicación 1, en donde el constructo se mantiene en una cepa de bacteria, seleccionada del grupo que consiste de *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Phyllobacterium myrsirzacearum*, *SinoRhizobium meliloti*, y *MesoRhizobium loti*, en donde el polinucleótido deseado comprende una secuencia que comparte identidad de secuencia
20 con una secuencia objetivo en el genoma de célula de la planta.

En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un método para reducir el endulzamiento inducido por el frío en un tubérculo, que comprende expresar el constructo de la reivindicación 1 en una célula de un tubérculo, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos una parte de un gen R1 o con al menos una parte de un promotor del gen R1, (c) uno o ambos del primer 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 de ese modo el endulzamiento inducido por el frío en el tubérculo.
25

En un quinto aspecto de la invención, se proporciona un método para mejorar la tolerancia a la mancha negra por magulladura en un tubérculo, que comprende expresar el constructo de la reivindicación 1 en una célula de un tubérculo, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos parte de un gen de polifenol oxidasa expresado en tubérculo un promotor del gen de polifenol oxidasa expresado en tubérculo, (c) uno o ambos del primer y segundo promotores son GBSS o AOP 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, mejorando de ese modo la tolerancia del tubérculo a la mancha negra por magulladura.
30
35

En un sexto aspecto de la invención, se proporciona un método para aumentar los niveles de ácido oleico en una planta oleaginosa, que comprende expresar el constructo de la reivindicación 1 en una célula de una semilla de una planta oleaginosa, en donde (a) el primer polinucleótido comprende una secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos una parte de un gen Fad2 o un promotor del gen Fad2, (c) uno o ambos del primer y segundo promotores son promotores del gen napina, gen Fad2 o gen 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 oleaginosa, aumentando de ese modo el contenido de aceite de la semilla.
40

En un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un método para reducir el contenido de lignina en una planta, que comprende expresar el constructo de la reivindicación 1 en una célula de la planta, en donde (a) el primer polinucleótido comprende una secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos parte de la secuencia del promotor asociado con un gen seleccionado del grupo que consiste de gen ácido cafeico/ácido 5-hidroxiferúlico 3/5-O-metiltransferasa (COMT) y gen cafeoil CoA 3-O-metiltransferasa (CCOMT), (c) uno o ambos del primer y segundo promotores son promotores de los genes petE o Pal y (d) la expresión del constructo en la célula reduce la transcripción y/o traducción de un gen COMT o CCQMT en la célula de la planta, reduciendo de ese modo el contenido de lignina en una planta.
45
50

En un octavo aspecto de la invención, se proporciona un método para reducir la degradación de pectina en una fruta de una planta, que comprende expresar el constructo de la reivindicación 1 en una célula de fruta de la planta, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia de parte del gen de poligalacturonasa, (c) ambos del primer y segundo promotores son promotores específicos de fruta, y (d) la expresión del constructo en la célula de fruta reduce la transcripción y/o traducción de un gen de poligalacturonasa en la célula de la planta, reduciendo de ese modo la degradación de pectina en la fruta.
55

En un noveno aspecto de la invención, se proporciona un método para reducir la alergenicidad de un alimento producido por una planta, que comprende expresar el constructo de la reivindicación 1 en una célula de una planta, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia de parte de un gen que codifica un alérgeno, y (c) la expresión del constructo reduce la transcripción y/o traducción del alérgeno, reduciendo de ese modo la alergenicidad de un alimento producido por la planta.

En un décimo aspecto de la invención, se proporciona un método para regular negativamente la expresión de múltiples genes en una planta, que comprende expresar en una célula de una planta (1) un constructo que comprende la secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos parte de la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 40, que regula negativamente la expresión de polifenol oxidasa, gen de fosforilasa L y el gen R1 en la célula de la planta; o (2) un constructo que comprende la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 42, que regula negativamente la expresión de polifenol oxidasa, gen de fosforilasa L y el gen R1 en la célula de la planta.

Las modalidades preferidas de la invención en cualquiera de sus varios aspectos son como se describen más abajo o como se definen en las sub reivindicaciones.

La presente descripción proporciona un constructo que carece de un terminador o carece de un terminador que se precede por una ribozima de autoempalme que codifica la región de ADN, pero que comprende un primer promotor que se enlaza operativamente a un primer polinucleótido y un segundo promotor que se enlaza operativamente al segundo polinucleótido, de manera que (1) el primer y segundo polinucleótido comparten al menos alguna identidad de secuencia uno con el otro, (2) el primer promotor se orienta tal que la dirección de la transcripción iniciada por este promotor procede hacia el segundo promotor, y viceversa, y (3) este arreglo convergente produce una variedad de transcritos de ARN que son generalmente diferentes en longitud.

Los polinucleótidos deseados pueden ser repeticiones perfectas o imperfectas de uno al otro o repeticiones complementarias perfectas o imperfectas inversas de uno al otro. En el caso de un constructo que comprende un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, el segundo polinucleótido puede ser completamente o parcialmente idéntico en secuencia de nucleótidos al primer polinucleótido y se orienta en la orientación complementaria directa o inversa con respecto al primer polinucleótido. De ahí que, el primer y segundo polinucleótidos pueden ser repeticiones perfectas de uno al otro. Por otro lado, el segundo polinucleótido, puede ser una repetición imperfecta del primer polinucleótido, es decir el segundo polinucleótido puede compartir identidad de secuencia con el primer polinucleótido, pero no es completamente o parcialmente idéntico en secuencia, es decir, el segundo polinucleótido es una repetición imperfecta. Ese segundo polinucleótido además se puede orientar como una repetición directa o posicionada en la orientación complementaria inversa con respecto al primer polinucleótido.

Cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente, tales como un polinucleótido deseado, o un primer o segundo polinucleótido, por ejemplo, pueden ser idénticos con al menos una parte de una 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, es decir, comparte identidad de secuencia con "al menos una parte de" una secuencia objetivo, entonces puede ser deseable que la secuencia de nucleótidos del fragmento sea específica al gen objetivo, y/o la secuencia perfecta parcial o imperfecta del objetivo que está presente en el polinucleótido deseado sea de suficiente longitud para conferir especificidad de objetivo. De ahí que la porción del polinucleótido deseado que comparte identidad de secuencia con una parte de una secuencia objetivo puede comprender un dominio característico, sitio de unión, o secuencia de nucleótidos típicamente conservada por isoformas u homólogos de la secuencia objetivo. Es posible, por lo tanto, diseñar un polinucleótido deseado que es óptimo para dirigir un ácido nucleico objetivo en una célula.

El polinucleótido deseado puede comprender una secuencia de preferentemente entre 4 y 5,000 nucleótidos, con mayor preferencia entre 50 y 1,000 nucleótidos, y con la máxima preferencia 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 estos, 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 nucleótidos con una secuencia de la secuencia objetivo. En otras palabras el polinucleótido deseado puede ser homólogo con o compartir homología con la secuencia completa de una secuencia objetivo o un fragmento de esta de una secuencia objetivo.

De ahí que, la presente descripción proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que comparte homología con una secuencia objetivo y que, por lo tanto, pueden hibridar bajo condiciones de hibridación rigurosas o moderadas con una porción de una secuencia objetivo descrita en la presente. Por un polinucleótido que hibrida con una "porción" de un polinucleótido se pretende un polinucleótido (ya sea ADN o ARN) que hibrida con al menos aproximadamente 15 nucleótidos y con mayor preferencia al menos aproximadamente 20 nucleótidos y aún con mayor preferencia al menos aproximadamente 30 nucleótidos y aún con mayor preferencia más de 30 nucleótidos del polinucleótido de referencia. Para el propósito de la invención, dos secuencias que comparten homología, es decir, un polinucleótido deseado y una secuencia objetivo, pueden hibridar cuando forman un complejo de cadena doble en una solución de hibridación de 6X SSC, 0.5% SDS, solución 5X de Denhardt y 100 µg de ADN portador inespecífico. Ver Ausubel y otros, sección 2.9, suplemento 27 (1994). Tal secuencia puede hibridar en "rigurosidad moderada," que se define como una temperatura de 60 °C en una solución de hibridación de 6X SSC, 0.5% SDS, solución 5X de Denhardt y 100 µg de ADN portador inespecífico. Para la hibridación de "rigurosidad alta", la temperatura se aumenta a 68 °C. A continuación de la reacción de hibridación de rigurosidad moderada, los nucleótidos se lavan en una solución de 2X SSC más 0.05% SDS por cinco veces a temperatura ambiente con lavados posteriores con 0.1 X SSC más 0.1% SDS a 60 °C durante 1 h. Para la rigurosidad alta, la temperatura de lavado se aumenta a típicamente una temperatura que sea aproximadamente 68 °C. Los nucleótidos hibridados pueden ser los que se detectan usando 1 ng de una sonda radiomarcada que tiene una radiactividad específica de 10,000 cpm/ng, donde los nucleótidos hibridados son claramente visibles a continuación de la exposición al film 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 se expresa normalmente por una célula que contiene el constructo, 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%, 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% en comparación con una célula que no contiene el constructo.

Cualquier polinucleótido, ya 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 en la presente descripción, una secuencia objetivo puede ser, pero sin limitarse a, una secuencia, parcial o completa, de un gen, elemento regulador, tal como un promotor o terminador, exón, intrón, una región sin traducir o cualquier secuencia corriente arriba o corriente abajo de una secuencia genómica-objetivo. En consecuencia, un polinucleótido puede comprender una secuencia que es idéntica en longitud de la secuencia con una secuencia objetivo de ese tipo. Por otro lado, el polinucleótido puede comprender una secuencia que comparte identidad de secuencia con una secuencia objetivo de ese tipo. De ahí que; 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 nucleótidos con una secuencia de la secuencia objetivo.

Un polinucleótido deseado puede comprender una secuencia que se deriva a partir de un promotor objetivo. El promotor objetivo o puede naturalmente estar presente en el genoma de la célula, es decir, el promotor objetivo es endógeno al genoma de la célula, o se puede introducir en el genoma a través de transformación. El promotor derivado del polinucleótido puede ser funcionalmente activo y contener una caja TATA o secuencia tipo caja TATA, pero ni la transcripción comienza ni cualquier secuencias transcritas comienzan fuera de la transcripción. Alternativamente, el promotor derivado del polinucleótido puede ser funcionalmente inactivo por, por ejemplo, la ausencia de una caja TATA. Un promotor derivado de ese tipo puede representar sólo parte del promotor objetivo.

El polinucleótido deseado puede comprender una secuencia que es específica a un intrón que es endógeno a un genoma de la célula.

El polinucleótido deseado puede comprender una secuencia que es parte de un terminador que es endógeno a un genoma de la célula.

El constructo puede comprender dos promotores idénticos que son funcionalmente activos en un tejido objetivo. El constructo puede comprender dos promotores diferentes, cada uno del cual es funcionalmente activo en un tejido objetivo.

5 Un constructo puede comprender además uno o más polinucleótidos adicionales entre el casete A y casete B. Por ejemplo, en la orientación 5' a 3', un constructo puede comprender (i) un primer promotor, (ii) un polinucleótido deseado, (iii) un separador de polinucleótido adicional, por ejemplo, un intrón, (iv) la copia de complemento inverso del polinucleótido deseado y (v) un segundo promotor, donde el primer y segundo promotores se enlazan operativamente al polinucleótido deseado y la copia complementaria, respectivamente, y se orientan para inducir la transcripción convergente.

10 El polinucleótido separador adicional puede ser de cualquier longitud. Esto es, el polinucleótido separador puede ser un intrón que es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 0, 1, 12, 3, 14, 5, 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 estos de longitud. Si el polinucleótido separador entre dos polinucleótidos deseados es lo suficientemente largo, la transcripción nunca puede proceder a partir del promotor con el otro. Es decir, por cualquier razón, la transcripción se puede detener mientras la maquinaria de transcripción se ubica en el separador que no contiene un elemento terminador funcionalmente activo. En consecuencia, el transcrito resultante puede comprender la secuencia completa de un primer polinucleótido deseado y una secuencia parcial del intrón, pero ninguna parte del segundo polinucleótido deseado. Así, es posible diseñar un constructo como se describe en la presente con un polinucleótido separador que previene la transcripción a partir del procedente de un polinucleótido deseado con el otro. En una situación de ese tipo y si uno de los polinucleótidos deseados se orienta como la copia complementaria inversa del otro, después la prevención de la lectura de la transcripción puede, por lo tanto, evitar la síntesis de un transcrito de ARN que es auto-complementario.

25 En consecuencia, dependiendo de cualquiera de (i) el arreglo convergente de promotores y polinucleótidos deseados, (ii) el número de copias de los polinucleótidos deseados, (iii) la ausencia de una región terminador del constructo y (iv) la complementariedad y longitud de los transcritos resultantes, varias poblaciones de moléculas de ARN se pueden producir a partir de los presentes constructos.

30 De ahí que, un único constructo puede producir (i) un transcrito de ARN "sentido" monocatenario, (ii) un transcrito de ARN "antisentido" monocatenario, (iii) una horquilla bicatenaria formada por un transcrito de ARN monocatenario que hibrida a sí mismo o (iv) un ARN bicatenario formado a partir de dos transcritos distintos de ARN que aparean el uno al otro. Un único constructo se puede diseñar para producir transcritos de ARN sólo sentido o sólo antisentido a partir de cada promotor arreglado de forma convergente.

35 La presente descripción describe además un método para reducir la expresión de un gen normalmente capaz de ser expresado en una célula de la planta, mediante la incorporación estable de cualquiera de los constructos descritos en la presente dentro del genoma de una célula.

40 En este sentido, cualquier tipo de célula a partir de cualquier especie se puede exponer a o transformar establemente o transitoriamente con un constructo. De ahí que, una célula bacteriana, célula viral, célula fúngica, célula de alga, célula de gusano, célula de la planta, célula de insecto, célula de reptil, célula de ave, célula de pez o célula de mamífero se puede transformar con un constructo. La secuencia objetivo, por lo tanto, se puede ubicar en el núcleo o un genoma de cualquiera de tales tipos de células. La secuencia objetivo, por lo tanto, se puede ubicar en un gen en el genoma de la célula. De ahí que, la secuencia objetivo se puede ubicar en al menos uno de un elemento regulador del gen, un exón del gen, un intrón del gen, la región 5' no traducida del gen o la región 3' no traducida del gen. El elemento regulador del gen puede ser al menos uno del elemento promotor o un potenciador del gen.

50 Alternativamente, la secuencia objetivo se puede ubicar en un transcrito de ARN que está presente en una de estas células y que se puede o no se puede normalmente producir por la célula. Es decir, el transcrito de ARN que comprende la secuencia objetivo se puede producir a partir de una fuente que es ajena a la célula huésped. Por ejemplo, el transcrito de ARN que comprende la secuencia objetivo puede ser de origen viral pero existe en una célula de la planta.

55 La presente descripción contempla además la exposición in vitro, ex vivo, ex planta e in vivo y la integración del constructo deseado en el genoma de la célula o preparaciones del ácido nucleico aislado.

Los constructos, por ejemplo, se pueden insertar en los plásmidos de transformación derivados de Agrobacterium que contienen elementos borde ADN-T necesarios para transformar las células de la planta. En consecuencia, un cultivo de

células de plantas se puede transformar, con un constructo de transformación de ese tipo y las células transformadas con éxito, crecen en una planta transgénica deseada que expresa los casetes promotor/polinucleótido que operan de forma convergente.

- 5 Los promotores pueden ser promotores inducibles o constitutivos o permutaciones de estos. Los promotores "fuerte", por ejemplo, pueden ser los aislados de virus, tales como virus baciliforme del tungro del arroz, virus del rayado del maíz, virus de nervadura de mandioca, virus mirabilis, caulimovirus del rayado clorótico de cacahuete, virus mosaico de escrofularia y virus chlorella. Otros promotores se pueden clonar a partir de especies bacterianas tales como los promotores del gen de la nopalina sintasa y octopina sintasa. Existen varios promotores inducibles, pero 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 hsp17.7 G4, un promotor de trigo wcs120, un promotor del gen Rab 16A, un promotor del gen de [alfa]-amilasa, un promotor del gen pin2 o un promotor de carboxilasa.

- 15 La presente descripción describe además 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 primer ni el segundo polinucleótido se enlazan operativamente a un terminador, (b) al menos parte del segundo polinucleótido es sustancialmente idéntico en la secuencia de nucleótidos con al menos parte de la secuencia del primer polinucleótido pero se posiciona 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 a partir del segundo promotor es hacia el primer promotor.

Al menos parte del segundo polinucleótido se puede orientar como una copia de complemento inverso de al menos parte del primer polinucleótido.

- 25 La secuencia que termina la transcripción, a la que ningún polinucleótido se enlaza operativamente, puede ser una secuencia en el extremo 3' de un gen que se implica en la formación y la poliadenilación del extremo 3' del transcrito de ese gen.

La secuencia que se implica en la formación y poliadenilación del extremo 3' puede ser un terminador.

- 30 El casete de expresión no puede comprender (i) un terminador de gen nos, (ii) la secuencia no traducida 3' del gen 7 de ADN-T, (iii) las secuencias no traducidas 3' del gen de la proteína del cuerpo de inclusión mayor del virus del mosaico del coliflor, (iv) las secuencias no traducidas 3' de la subunidad pequeña 1,5-bifosfato carboxilasa del chícharo ribulosa, (v) las secuencias no traducidas 3' del gen de ubiquitina-3 de patata, o (vi) las secuencias no traducidas 3' del gen II inhibidor de proteinasa de patata, (vii) las secuencias no traducidas 3' de genes opina, (viii) las secuencias no traducidas 3' de genes endógenos.

- 35 El primer polinucleótido puede comprender una secuencia que comparte identidad de secuencia con un gen objetivo o al menos uno de un elemento regulador que se asocia con el gen objetivo, un exón del gen objetivo, un intrón del gen objetivo, la región no traducida 5' del gen objetivo o la región no traducida 3' del gen objetivo.

- 45 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.

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

- 55 En la presente descripción, (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 sec. con núm. de ident.: 44.

El gen objetivo se puede ubicar en el genoma de una célula. De ahí que, la célula puede ser una célula de una bacteria, virus, hongo, levadura, planta, reptil, ave, pez o mamífero.

- 5 La secuencia objetivo se puede ubicar en una secuencia de ADN que codifica un transcrito de ARN.

El primer y segundo promotores pueden ser funcionales en una planta.
- 10 El casete de expresión se puede ubicar entre secuencias borde del ADN de transferencia de un plásmido que es adecuado para la transformación de planta mediado por bacteria.

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*.
- 15 El constructo puede comprender además un polinucleótido separador posicionado entre el primer y segundo polinucleótidos. El polinucleótido separador puede ser 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 largo.
- 20 El primer promotor puede ser promotor constitutivo cercano, un promotor específico de tejido, o un promotor inducible y en donde el segundo promotor es un promotor constitutivo cercano, un promotor específico de tejido o un promotor inducible.
- 25 El promotor constitutivo fuerte puede seleccionarse del grupo que consiste de un promotor de ubiquitina-7 de patata, un promotor de ubiquitina-3 de patata, un promotor de ubiquitina de tomate, un promotor 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 ubiquitina de caña de azúcar, un promotor de actina de arroz, un promotor de la subunidad pequeña de rubisco y un promotor de activasa de rubisco.
- 30 El promotor específico de tejido puede ser el promotor de sintasa de almidón unido a gránulo o un promotor del gen de ADP glucosa pirofosforilasa.

El promotor inducible puede ser un promotor sensible a la temperatura, un promotor inducido químicamente o un promotor temporal.
- 35 El promotor inducible se selecciona del grupo que consiste de un promotor Ha hsp17.7 G4, un promotor wcs120 de trigo, un promotor del gen Rab 16A, un promotor del gen α -amilasa, un promotor del gen pin2 y un promotor de carboxilasa.
- 40 La presente descripción describe además un plásmido de transformación, que comprende un casete de expresión, que comprende en la orientación 5' a 3' (1) un primer promotor que se enlaza operativamente a (2) un primer polinucleótido deseado, que está contiguo a (3) al menos un polinucleótido opcional separador, donde el extremo 3' de uno de los polinucleótidos separadores está contiguo a (4) un segundo polinucleótido deseado, que se enlaza operativamente a (5) un segundo promotor, en donde tampoco el polinucleótido deseado en el casete de expresión se enlaza operativamente a ningún terminador de transcripción conocido.
- 45 Al menos parte del primer polinucleótido deseado puede estar en la orientación antisentido y en donde al menos parte del segundo polinucleótido deseado se puede orientar como el complemento inverso del primer polinucleótido deseado.
- 50 Al menos parte del primer polinucleótido deseado puede estar en la orientación sentido y en donde al menos parte del segundo polinucleótido deseado se puede orientar como el complemento inverso del primer polinucleótido deseado.

Al menos parte del primer polinucleótido deseado puede ser una secuencia promotor.
- 55 La secuencia promotor puede ser de un promotor seleccionado del grupo que consiste de (1) un promotor del gen R1 asociado de almidón, (2) un promotor del gen polifenol oxidasa, (3) un promotor del gen 12 desaturasa de ácido graso, (4) un promotor del gen microsomal de desaturasa de ácido graso omega-6, (5) un promotor del gen de algodón delta 9 estearoil desaturasa de proteína portadora de acilo, (6) un promotor del gen de desaturasa de oleoil-fosfatidilcolina omega 6, (7) un promotor del gen de Medicago truncatula de ácido cafeico/ácido 5-hidroxifeúlico 3/5-O-metiltransferasa (COMT), (8) un

promotor del gen de *Medicago sativa* (alfalfa) de ácido cafeico/ácido 5-hidroxifeúlico 3/5-O-metiltransferasa (COMT), (9) un promotor del gen de *Medicago truncatula* de cafeoil CoA 3-O-metiltransferasa (CCOMT), (10) un promotor del gen de *Medicago sativa* (alfalfa) de cafeoil CoA 3-O-metiltransferasa (CCOMT), (11) un promotor del gen de alérgeno mayor de manzana Mal d 1, (12) un promotor del gen de alérgeno mayor de cacahuete Ara h 2, (13) un promotor del gen de alérgeno mayor de soja Gly m Bd 30 Ky (14) un promotor del gen de polilacturonasa.

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

El primer y segundo promotores pueden ser promotores GBSS.

Tanto el primer promotor puede ser un promotor GBSS como el segundo promotor puede ser un promotor AGP.

La presente descripción además describe un método para reducir la expresión de un gen normalmente capaz de ser expresado en una célula de la planta, que comprende exponer una célula de la planta a cualquier constructo descrito en la presente, en donde el constructo se mantiene en una cepa de bacteria, en donde el polinucleótido deseado comprende una secuencia que comparte identidad de secuencia con una secuencia objetivo en el genoma de la célula de la planta.

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

La presente descripción 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 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 parte del promotor del gen objetivo y (iv) un segundo promotor, en donde el primer promotor se enlaza operativamente con el extremo 5' del primer polinucleótido y el segundo promotor se enlaza operativamente con el extremo 3' del segundo polinucleótido,

La presente descripción describe además 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 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 parte del promotor del gen objetivo y (iv) un terminador, en donde el primer promotor se enlaza operativamente con el extremo 5' del primer polinucleótido y el segundo promotor se enlaza operativamente al terminador.

La presente descripción además describe un plásmido de transformación de la planta, que comprende la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 40 o 42.

La presente descripción además describe un método para reducir el endulzamiento inducido por el frío en un tubérculo, que comprende expresar cualquier constructo descrito en la presente 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) uno o ambos del primer 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 de ese modo el endulzamiento inducido por el frío en el tubérculo. El primer polinucleótido puede comprender la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 23 o 24. El tubérculo puede ser una patata. El primer polinucleótido puede comprender dos copias de la secuencia de sec. con núm. de ident.: 23 o 24.

La presente descripción además se relaciona con un método para mejorar la tolerancia a la mancha negra por magulladura que comprende expresar cualquier constructo descrito en la presente 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 primer 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, mejorando de ese modo la tolerancia del tubérculo a la mancha negra por magulladura. En una modalidad, el primer polinucleótido comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 26 o 27. El tubérculo puede ser una patata. El primer polinucleótido puede comprender dos copias de la secuencia de sec. con núm. de ident.: 26 o 27.

La presente descripción además se relaciona con un método para aumentar los niveles de ácido oleico en una planta oleaginosa, que comprende expresar cualquier constructo descrito en una célula de una semilla de una planta oleaginosa,

en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia de parte de un gen Fad2 (b) el segundo polinucleótido es el complemento inverso del primer polinucleótido (c) uno o ambos del primer y segundo promotores son promotores del gen napina, gen Fad2 o gen 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 oleaginosa, aumentando de ese modo el contenido de aceite de la semilla. El primer polinucleótido puede comprender la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 28. La secuencia del promotor del gen napina puede comprender la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 30.

La secuencia del promotor del gen estearoil-ACP desaturasa puede comprender la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.:31.

La secuencia del promotor del gen Fad2 puede comprender la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 32.

La planta oleaginosa puede ser la planta *Brassica*, planta de canola, planta de soja, planta de algodón o una planta de girasol.

La presente descripción describe además un método para reducir el contenido de lignina en una planta, que comprende expresar cualquier constructo descrito en la presente 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 primer y segundo promotores son promotores de los genes 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 de ese modo el contenido de lignina en la planta. La célula puede estar en el sistema vascular de la planta. En un modalidad preferida, la planta es una planta de alfalfa. El primer polinucleótido puede comprender la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.:33 o 37.

La presente descripción describe un método para reducir la degradación de pectina en una fruta de una planta, que comprende expresar cualquier constructo descrito en la presente en una célula de fruta de la planta, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia de parte del gen de poligalacturonasa, (b) el segundo polinucleótido es el complemento inverso del primer polinucleótido, (c) ambos del primer y segundo promotores son promotores específicos de fruta, y (d) la expresión del constructo en la célula de fruta reduce la transcripción y/o traducción de un gen de poligalacturonasa en la célula de la planta, reduciendo de ese modo la degradación de pectina en la fruta. El primer polinucleótido puede comprender la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 39.

La presente descripción describe un método para reducir la alergenicidad de un alimento producido por una planta, que comprende expresar cualquier constructo descrito en la presente 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 de ese modo la alergenicidad de un alimento producido por la planta.

En la presente descripción, (a) la planta puede ser una planta de manzana, (b) el alimento puede ser una manzana, (c) el primer polinucleótido puede comprender una secuencia de promotor del gen Mal d, 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.

En la presente descripción, (a) la planta puede ser una planta de cacahuete (b) el alimento puede ser un cacahuete, (c) el primer polinucleótido puede comprender una secuencia de promotor del gen de Ara h 2 y (d) la expresión del constructo en la planta de cacahuete reduce la transcripción y/o traducción de Ara h 2 en el cacahuete.

En la presente descripción, (a) la planta puede ser una planta de soja, (b) el alimento puede ser un soja, (c) el primer polinucleótido puede comprender una secuencia de promotor del gen de 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 el soja.

La presente descripción describe un método para regular negativamente la expresión de múltiples genes en una planta, que comprende expresar en una célula de una planta un constructo que comprende la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 40, que regula negativamente la expresión de polifenol oxidasa, gen de fosforilasa L y el gen R1 en la célula de la planta.

La presente descripción describe un método para regular negativamente la expresión de múltiples genes en una planta, que comprende expresar en una célula de una planta un constructo que comprende la secuencia representada en la sec. con

núm. de ident.: 42, que regula negativamente la expresión de polifenol oxidasa, gen de fosforilasa L y el gen R1 en la célula de la planta.

5 La presente descripción describe un constructo, que comprende un promotor deseado que se enlaza operativamente a (i) un primer promotor en su extremo 5' y (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.

10 La presente descripción describe un constructo, que comprende unas dos copias orientadas convergentemente de un promotor deseado que se separan 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 convergentemente puede ser un intrón.

15 La presente descripción se relaciona con un constructo, que comprende dos promotores deseados que se enlazan 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, en al menos una parte de sus respectivas longitudes, identidad de secuencia uno con el otro y donde uno de los promotores deseados se puede orientar como el complemento inverso del otro.

20 La presente descripción se relaciona con un constructo, que comprende dos promotores deseados que se enlazan 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, en al menos una parte de sus respectivas longitudes, identidad de secuencia uno con el otro y donde uno de los promotores deseados se puede orientar como el complemento inverso del otro.

25 La descripción del producto se relaciona con un constructo que comprende cuatro repeticiones directas de un polinucleótido de interés, que se preceden por un fragmento ADN antisentido del polinucleótido de interés. Un constructo de ese tipo se representa por pSIM1111.

30 La presente descripción proporciona además 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 arreglados en una orientación convergente uno con el otro, en donde la actividad de los promotores del casete reduce el nivel de expresión de un gen endógeno alfalfa, que se enlaza operativamente en el genoma de alfalfa con 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 se representa en la sec. con núm. de ident.: 54 o sec. con núm. de ident.: 55.

La descripción presente proporciona además un método para reducir la expresión de un gen Comt, que comprende expresar un fragmento de gen Comt o fragmento del promotor Comt en una célula que comprende un gen Comt en su genoma.

40 La presente descripción proporciona además un método para reducir la expresión de un gen Comt o gen Ccomt, que comprende expresar el constructo de cualquier constructo descrito en la presente 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 promotor del gen Comt o un gen Ccomt o promotor del gen Ccomt.

45 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa los diagramas esquemáticos de los ADN-T de vectores binarios que (a) representan un control negativo (pSIM714) y (b) comprenden los constructos que representan constructos convencionales de silenciamiento, pSIM374, pSIM718, y PSIM755. "B" denota una secuencia borde de ADN de transferencia; "T" denota una secuencia terminador; "hptII" es un gen de resistencia que confiere resistencia a higromicina a una planta; "P1" denota una secuencia promotor y, en este ejemplo, es un promotor que es idéntico al promotor que conduce un gen funcionalmente activo beta-glucuronidasa (gus) en la planta gus transgénica; "P2" denota una secuencia promotor que es además funcionalmente activo pero diferente de P1; "gus-S" denota un fragmento de gen gus; "gus-A" denota un complemento inverso del fragmento de gen gus; "I" denota un intrón. Con respecto a gus-S y gus-A, las flechas gruesas sólidas significan (parte del) transcritos de ARN que comparten identidad con una parte del transcrito producido por la expresión del gen gus; las flechas gruesas con puntos significan (parte del) transcritos de ARN que comparten identidad con una parte del complemento inverso del transcrito de gen gus; las líneas delgadas significan partes del transcrito con homología o complementariedad inversa a otra secuencia tal como el intrón del constructo. Con respecto a esto, la flecha abierta que apunta hacia la izquierda (que denota

el elemento "gus-A" en el casete) indica que el elemento gus-A se orienta en el casete de expresión según el complemento inverso de gus-S, la flecha que apunta hacia la derecha. De ahí que, los promotores P1 y P2 se orientan de manera que la transcripción de cada uno procede en una manera convergente, es decir, procede de la transcripción de P1 a P2 y viceversa.

La Figura 2 representa diagramas esquemáticos para los ADN-T de vectores binarios que comprenden constructos que se asemejan a constructos de silenciamiento convencionales excepto que carecen de un terminador, pSIM728, PSIM140 y pSTM758. Con respecto a gus-S y gus-A, las flechas gruesas sólidas significan la parte de transcritos de ARN que comparten identidad con una parte del transcrito producido por la expresión del gen gus; las flechas gruesas con puntos significan partes de transcritos de ARN que comparten identidad con una parte del complemento inverso del transcrito de gen gus; las líneas delgadas significan partes del transcrito con homología o complementariedad inversa a otra secuencia tal como el intrón del constructo.

La Figura 3 representa los diagramas esquemáticos de los ADN-T que comprenden constructos de "transcripción de colisión libre de terminador" (TFCT). Específicamente, ilustra los ADN-T de pSIM715, PSIM717, pSIM756 y pSIM771. La clave para los elementos identificados y flechas sólidas y con puntos es la misma que la explicada en la leyenda de la Figura 1. En pSIM717, la lectura a través de la transcripción originada tanto de P1 como P2 en el intrón produce transcritos que contienen secuencias 5' idénticas a parte del transcrito del gen gus y secuencias 3' que son complementarias inversas al transcrito del gen gus. Estos transcritos se pueden plegar para producir parcialmente ARN de cadena doble. Dependiendo de la capacidad del complejo de transcripción P1 para proceder sin trabas, un transcrito de ARN, iniciado desde el promotor P1, posiblemente puede transcribir secuencias corriente abajo de la secuencia gus-S a la que se enlaza operativamente. En consecuencia, al leer la "parte superior", es decir, cadena sentido de pSIM717, en la dirección 5' a 3', un transcrito de P1 puede comprender la secuencia del intrón que interviene ("I"), así como la secuencia del elemento gus-S complemento inverso. La secuencia de cadena de la "parte superior" del elemento gus-S complemento inverso es el antisentido de gus-S.

La Figura 4 representa los diagramas esquemáticos de los ADN-T que comprenden constructos de "transcripción de colisión libre de terminador" (TFCT). Específicamente, ilustra los ADN-T de pSIM754, pSIM773 y pSIM767. La clave de los elementos identificados y flechas sólidas y con puntos es la misma que la explicada en la leyenda de la Figura 1. Pln indica la parte del promotor P1 que está corriente arriba a partir de la caja TATA. Esta secuencia no es funcional como promotor.

La Figura 5 representa los diagramas esquemáticos de los ADN-T que comprenden constructos de "transcripción de colisión libre de terminador" (TFCT). Específicamente, ilustra los ADN-T de pSIM782. La clave para los elementos identificados y flechas sólidas y con puntos es la misma que la explicada en la leyenda de la Figura 1. gusI indica el intrón del gen gus.

La Figura 6 representa los diagramas esquemáticos de los ADN-T que comprenden constructos de "transcripción de colisión libre de terminador" (TFCT). Específicamente, ilustra los ADN-T de pSIM765, pSIM922F, pSIM922G, pSIM774, y pSIM775. La clave de los elementos identificados y flechas sólidas y con puntos es la misma que la explicada en la leyenda de la Figura 1. PPO indica un fragmento del gen PPO de tabaco.

La Figura 7 muestra geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio que contienen los productos de RT-PCR. + = control de plásmido positivo; - = control negativo; M = marcador; T1 = transcrito del promotor P1; T2 = transcrito del promotor P2.

La Figura 8 muestra autoradiogramas de membrana de transferencia de gel de ARN. La sonda usada para la hibridación se derivó del gen gus.

La Figura 9 muestra un análisis de la secuencia de varios fragmentos del promotor e identifica una secuencia de 89-pb que puede ser metilada durante el silenciamiento basado en el promotor.

La Figura 10 representa mapas del plásmido G: fragmento del gen gus; H: casete expresión para el gen hptII; LB: región borde izquierdo; RB: región borde derecho; T: terminador; P1: promotor P1; P1n: promotor no funcional P1 que carece de una caja TATA; P2: promotor P2; P3: promotor P3; GB: promotor GBSS; PP: fragmento del gen PPO; PT = fragmento del gen de tabaco PPO. La dirección de transcripción se indica con una flecha sólida negra pequeña.

Descripción detallada de las modalidades preferidas

Un constructo de la presente descripción se puede usar eficazmente para reducir o prevenir la transcripción o traducción de un ácido nucleico objetivo mediante la activación de la transcripción convergente de un polinucleótido deseado. De ahí que

un objetivo de la presente invención es proporcionar constructos que producen moléculas de ácido nucleico que previenen o reducen la expresión de un gen o de un producto génico, tal como un transcrito de ARN o proteína.

- 5 Una característica particular de un constructo de ese tipo es que, en contraste con los constructos de silenciamiento convencionales, el terminador no funcional se inserta y se enlaza operativamente con el extremo 3' de un polinucleótido deseado. Se establece bien que un terminador es una secuencia de nucleótidos, típicamente ubicada en el extremo 3' de un gen, que se implica en la escisión del transcrito de ARN que se transcribe a partir del gen y en la poliadenilación de ese transcrito. Típicamente, un terminador se ubica corriente abajo del codón de parada de los genes.
- 10 Las terminaciones que se usaron para la construcción de los casetes de silenciamiento convencionales, y que se excluyen de los constructos de la presente invención, se derivaron a partir de tales regiones 3' de ciertos genes y frecuentemente incluyen además aún más secuencias de ADN no transcrito corriente abajo. La selección de cual terminador usar la mayoría de las veces, simplemente ha sido una cuestión de conveniencia. De ahí que, terminadores opina o regiones de terminación a partir de genes endógenos y previamente caracterizados se han usado en constructos de silenciamiento convencionales.
- 15 Uno de los terminadores más frecuentemente usados, por ejemplo, es el terminador del gen de nopalina sintasa (nos) de *Agrobacterium*, que comprende tanto secuencias no traducidas 3' como ADN corriente abajo adicional. Otros terminadores incluyen:
 - 20 Las secuencias 3' no traducidas del gen 7 de ADN-T (acceso de Genbank V00090).
 - Las secuencias 3' no traducidas del gen de la proteína mayor del cuerpo de inclusión del virus mosaico de la coliflor.
 - Las secuencias 3' no traducidas de la subunidad pequeña de ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa de chícharo (acceso de Genbank M21375).
 - 25 Las secuencias 3' no traducidas del gen de ubiquitina-3 de patata (acceso de Genbank Z11669).
 - Las secuencias 3' no traducidas del gen del inhibidor II de proteinasa de patata (acceso de Genbank CQ889094).
 - 30 Las secuencias 3' no traducidas de genes opina.
 - Las secuencias 3' no traducidas de genes endógenos; es decir genes que se expresan normalmente por el genoma de un organismo.
- 35 Con respecto a la presente descripción, sin embargo, ninguno de tales terminadores, claramente, terminador no funcional, se enlaza operativamente directamente a un polinucleótido deseado del presente constructo. Nor es un polinucleótido deseado directamente enlazado operativamente a un terminador que se precede por una secuencia que codifica el autoempalme de ribozima.
- 40 Otra característica del constructo de la presente descripción es que promueve la transcripción convergente de uno o más copias de polinucleótido que están o no están directamente enlazadas operativamente a un terminador, a través de dos promotores opuestos. Debido a la ausencia de una señal de terminación, la longitud de la mezcla de moléculas de ARN que se transcribe a partir del primer y segundo promotores puede ser de varias longitudes.
- 45 En ocasiones, por ejemplo, la maquinaria transcripcional puede continuar para transcribir pasado el último nucleótido que significa el "fin" de la secuencia de polinucleótido deseado. En consecuencia, en este arreglo particular, la terminación de la transcripción puede ocurrir ya sea a través de acción débil e involuntaria de secuencias corriente abajo que, por ejemplo, promueven la formación de la horquilla o a través de la acción de terminadores transcripcionales involuntarios ubicados en el ADN de la planta que flanquean el sitio de integración de ADN transferencia.
- 50 Un constructo de transcripción de colisión libre de terminador (TFCT) de la presente descripción, por lo tanto, puede comprender un primer promotor enlazado operativamente a un primer polinucleótido y un segundo promotor enlazado operativamente a un segundo polinucleótido, de manera que (1) el primer y segundo polinucleótidos comparten al menos alguna identidad de secuencia uno con el otro y un secuencia objetivo y (2) el primer promotor se orienta tal que la dirección de transcripción iniciada por este promotor procede hacia el segundo promotor y viceversa, (3) el constructo produce moléculas de ARN que generalmente son diferentes en tamaño, algunos transcritos que representan las contrapartes de ARN de al menos una parte del polinucleótido y otros que comprenden las contrapartes de al menos alguno tanto del polinucleótido como su complemento inverso.
- 55

El polinucleótido deseado se puede enlazar en dos orientaciones diferentes al promotor. En una orientación, por ejemplo, "sentido", al menos la parte 5' del transcrito de ARN resultante compartirá identidad de secuencia con al menos parte de al menos un transcrito objetivo. Un ejemplo de este arreglo se muestra en la Figura 3 como pSIM717. En la otra orientación designada como "antisentido", al menos la parte 5' del transcrito previsto será idéntica u homóloga con al menos parte del complemento inverso de al menos un transcrito objetivo. Un ejemplo del último arreglo se muestra en la Figura 3 como pSIM756.

Como se utiliza en la presente, "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido incluye la referencia a los residuos en las dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para la correspondencia máxima en una región especificada. Cuando se usa el porcentaje de identidad de secuencia como referencia para las proteínas se reconoce que las posiciones de residuos que no son idénticas difieren frecuentemente en las sustituciones conservativas de aminoácidos, donde los residuos de aminoácido se sustituyen por otros residuos de aminoácido 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 las sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Las secuencias que difieren en tales sustituciones conservativas se dice que tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Típicamente esto implica calificar una sustitución conservativa como una parcial en lugar de un desajuste completo, de ese modo aumenta el porcentaje de identidad de secuencia. Así, por ejemplo, cuando se da una puntuación de 1 a un aminoácido idéntico y a una sustitución no-conservativa se le da una puntuación de cero, a una sustitución conservativa se le da una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservativas se calcula, por ejemplo, de acuerdo con el algoritmo de Meyers y Miller, Computer Applic. (Intelligenetics, Mountain View, California, USA).

Como se utiliza en la presente, "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado por la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, interrupciones) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que el residuo de aminoácido o de base de ácido nucleico idéntico ocurre en ambas secuencias para producir 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 obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

Los métodos de alineación de secuencias para comparación se conocen bien en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede realizarse por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Match. 2: 482 (1981); por el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970); por la búsqueda para el método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 2444 (1988); por implementación computarizada de esos algoritmos, que incluyen, pero sin limitarse a: CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, California; GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el paquete de programas Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, USA; el programa CLUSTAL es bien descrito por Higgins y Sharp, Gene 73: 237-244 (1988); Higgins y Sharp, CABIOS 5: 55-153 (1989); Corpet, y otros, Nucleic Acids Research 16: 10881-90 (1988); Huang, y otros, Computer Applications in the Biosciences 8: 155-65 (1992), y Pearson, y otros, Methods in Molecular Biology 24: 307-331 (1994).

La familia de programas BLAST que se pueden usar para búsquedas de similitud de bases de datos incluye: BLASTN para la búsqueda de secuencias de nucleótidos contra secuencias de nucleótidos de bases de datos; BLASTX para la búsqueda de secuencias de nucleótidos contra secuencias de proteínas de base de datos; BLASTP para la búsqueda de secuencias de proteínas contra secuencias de proteínas de base de datos; TBLASTN para la búsqueda de secuencias de proteínas contra secuencias de nucleótidos de bases de datos; y TBLASTX para la búsqueda de secuencias de nucleótidos contra secuencias de nucleótidos de base de datos. Ver, Current Protocols in Molecular Biology, capítulo 19, Ausubel, y otros, Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1995); Altschul y otros, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); y, Altschul y otros, Nucleic Acids Res. 25:33 89-3402 (1997).

El software para ejecutar los análisis BLAST está disponible al público, por ejemplo, a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo incluye primero identificar los pares de secuencia con puntuación alta (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda, que coincide o satisface algunas puntuaciones T umbrales de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere como el umbral de puntuación de la palabra vecina. Estos

aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Las coincidencias de palabras se extienden entonces en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia, hasta alcanzar un punto en el cual la puntuación de alineamiento acumulado no aumente más. Los registros acumulativos se calculan por medio del uso de, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular el registro acumulativo. Las extensiones de los aciertos de las palabras vecinas en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en una cantidad X desde su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulativa va a cero o por debajo de cero debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos con puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para las secuencias nucleotídicas) usa como defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un corte de 100, M=5, N=-4, una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 89:10915).

Además de calcular el porcentaje de identidad de la secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. Estados Unidos 90:5873-5877 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad con que dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos coincidan al azar.

Las búsquedas BLAST asumen que las proteínas se pueden modelar como secuencias aleatorias. Sin embargo, muchas proteínas reales comprenden regiones de secuencias no aleatorias, que pueden ser extensiones homopoliméricas, repeticiones cortas, o regiones enriquecidas en uno o más aminoácidos. Tales regiones de baja complejidad pueden estar alineadas entre proteínas no relacionadas a pesar de que otras regiones de la proteína sean completamente diferentes. Un número de programas de filtro de baja complejidad se pueden emplear para reducir tales alineaciones 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 emplearse solos o en combinación.

El alineamiento múltiple de las secuencias se puede realizar usando el método de alineación CLUSTAL (Higgins y Sharp (1989) CABIOS 5:151:153) con los parámetros por defecto (penalización de interrupción=10, penalización de longitud de interrupción =10). Los parámetros por defecto para las alineaciones pares usando el método CLUSTAL son KTUPLE 1, PENALIZACIÓN DE INTERRUPCIÓN = 3, VENTANA = 5 y DIAGONALES SALVADAS = 5.

Cualquiera o todos los elementos y secuencias de ADN que se describen en la presente pueden ser endógenos a uno o más genomas de plantas. En consecuencia, todos los elementos y secuencias de ADN, los cuales se seleccionan para el casete de transferencia definitivo pueden ser endógenos a, o natural a, el genoma de la planta que debe ser transformada. Por ejemplo, todas las secuencias pueden provenir de un genoma de patata. Alternativamente, uno o más de los elementos o secuencias de ADN pueden ser endógenos a un genoma de la planta que no es lo mismo que las especies de la planta que se transforma, pero que funciona en cualquier caso en la célula de la planta huésped. Tales plantas incluyen plantas de patata, tomate y alfalfa. La presente descripción abarca además el uso de uno o más elementos genéticos de una planta que es interfértil con la planta que debe ser transformada.

Las preocupaciones del público se abordaron a través del desarrollo de un enfoque de todo natural para producir plantas por ingeniería genética, como lo describe Rommens y otros en WO2003/063980, US-2003-0221213, US-2004-0107455, y WO2005/004585. Rommens y otros enseñan la identificación y aislamiento de elementos genéticos de las plantas que se pueden usar para la transformación de la planta mediada por bacteria. Así, Rommens enseña que un ADN de transferencia derivado de planta ("ADN-P"), por ejemplo, se puede aislar a partir de un genoma de planta y usar en lugar de un ADN-T de *Agrobacterium* para plantas genéticamente modificadas.

Con respecto a esto, una "planta" incluye, pero sin limitarse a angiospermas y gimnospermas tales como patata, tomate, tabaco, aguacate, alfalfa, lechuga, zanahoria, fresa, remolacha, mandioca, patata dulce, soja, chícharo, frijol, pepino, uva, Brassica, maíz, césped, trigo, arroz, cebada, sorgo, avena, roble, eucalipto, nuez de Castilla, y palma. Por lo tanto, una planta puede ser una monocotiledónea o una dicotiledónea. "Planta" y "material de planta," abarca además las células de la planta, semilla, progenie de planta, propágulo generado ya sea por vía sexual o asexual y descendientes de cualquiera de éstos, tal como recortes o semilla. "Material de planta" puede referirse a las células de la planta, cultivos de suspensión celular, callo, embriones, regiones meristemáticas, tejidos de callo, hojas, raíces, brotes, gametofitos, esporofitos, polen, semillas, germinación de plántulas y microsporas. Las plantas pueden estar en varias etapas de madurez y se pueden

cultivar en cultivo líquido o sólido, o en el suelo o medios adecuados en macetas, invernaderos o campos. La expresión de unas secuencias introducidas líder, remolque o génicas en las plantas puede ser transitoria o permanente.

Así, cualquiera de tales plantas y materiales de plantas puede ser transformado. En este sentido, la transformación de una planta es un proceso por el cual el ADN se integra establemente en el genoma de una célula de la planta. "Establemente" se refiere a la retención permanente, o no-transitoria y/o expresión de un polinucleótido en y por un genoma de la célula. Así, un polinucleótido establemente integrado es uno que es un artefacto dentro de un genoma de la célula transformada y se puede replicar y propagar a través de la progenie sucesiva de la célula o planta transformada resultante. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales usando varios métodos bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bernard R. Glick y John E. Thompson (eds), CRC Press, Inc., London (1993); Chilton, Scientific American, 248(6), págs. 36-45, 1983 ; Bevan, Nucl. Acids. Res., 12, págs. 8711-8721, 1984; y Van Montague y otros, Proc R Soc Lond B Biol Sci., 210(1180), págs. 351-65, 1980. Las plantas pueden transformarse además usando las técnicas de "Transformación Refinada" y "Cultivo preciso". Ver, por ejemplo, Rommens y otros en WO2003/069980, US-2003-0221213, US-2004-010745, WO2005/004585, US-2004-0003434, US-2005-0034188, WO2005/002394, y WO2003/079765.

Uno o más rasgos de una planta que porta tubérculo se pueden modificar usando las secuencias de transformación y elementos descritos en la presente. Un "tubérculo" es un órgano de almacenamiento de alimentos, engrosado, por lo general subterráneo, que carece tanto de una placa basal como cubierta de tipo túnica, que tiene cormos y bulbos. Las raíces y brotes crecen a partir de los brotes de crecimiento, llamados "ojos", en la superficie del tubérculo. Algunos tubérculos, tales como caladiums, disminuirán de tamaño según las plantas crecen y forman tubérculos nuevos en los ojos. Otras, tales como las begonias tuberosas, aumentan de tamaño según almacenan nutrientes durante la temporada de crecimiento y desarrollan nuevos brotes de crecimiento al mismo tiempo. Los tubérculos pueden ser arrugados y duros o ligeramente carnosos. Pueden ser redondo, plano, forma irregular o áspero. Los ejemplos de tubérculos incluyen, pero sin limitarse a ahípa, apio, arracacha, punta de flecha, arrurruz, hará, mandioca amarga, arrurruz Brasileño, mandioca, alcachofa China, castaña de agua China, coco, ocumo, dasheen, eddo, oreja de elefante, girasol, goo, alcachofa Japonesa, papa japonesa, alcachofa de Jerusalén, jícama, raíz de lirio, ling gaw, mandioca, yuca, papa mexicana, batata mexicana, viejo ocumo, papa, saa got, satoimo, seegoo, sunchoke, sunroot, mandioca dulce, papa dulce, tanier, tannia, tannier, raíz de tapioca, topinambur, raíz de lirio de agua, batata, ñame y yautía. Los ejemplos de papas incluyen, pero sin limitarse a Papas Russet, Papas Blancas Redondas, Papas Blancas Largas, Papas Rojas Redondas, Papas de Pulpa Amarilla y Papa Azul y Púrpura.

Los tubérculos se pueden clasificar como "microtubérculos," "minitubérculos," tubérculos "casi-maduros" y tubérculos "maduros". Los microtubérculos son tubérculos que se cultivan en medio de cultivo de tejidos y son de tamaño pequeño. Por "pequeño" se denota aproximadamente 0.1 cm -1 cm. Un "minitubérculo" es un tubérculo que es más grande que un microtubérculo y se cultiva en el suelo. Un tubérculo "casi-maduro" se deriva de una planta que comienza a envejecer y es de aproximadamente 9 semanas si se cultiva en invernadero. Un tubérculo "maduro" es aquel que se deriva de una planta que ha sufrido el envejecimiento. Un tubérculo "maduro", por ejemplo, un tubérculo que tiene aproximadamente 12 o más semanas de edad.

Con respecto a esto, una secuencia borde de ADN de transferencia derivado de planta ("ADN-P") de la presente descripción no es idéntica en la secuencia de nucleótidos a cualquier secuencia borde de ADN-T derivado de bacteria, pero funciona para prácticamente el mismo propósito. Es decir, el ADN-P se puede usar para transferir e integrar un polinucleótido en otro. Un ADN-P se puede insertar en un plásmido inductor de tumor, tal como un plásmido-Ti de *Agrobacterium* en lugar de un ADN-T convencional y mantener en una cepa de bacteria, al igual que los plásmidos de transformación convencional. El ADN-P se puede manipular de manera que contenga un polinucleótido deseado, que se destina para la integración en un genoma de la planta a través de transformación de la planta mediada por bacterias. Ver Rommens y otros, en WO2003/069980, US-2003-0221213, US-2004-010745, y WO2005/004585.

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

Una secuencia borde de ADN-P no es más que 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 la secuencia de nucleótidos a una secuencia borde de ADN-T de *Agrobacterium*.

Los métodos se desarrollaron para la identidad y para aislar los ADN de transferencia a partir de las plantas, particularmente papas y trigo e hicieron uso del consenso de motivos borde descritos en US-2004-0107455.

5 En este sentido, un ADN derivado de plantas de la presente descripción, tal como cualquiera de las secuencias, sitios de escisión, regiones, o elementos descritos en la presente descripción es funcional si promueve la transferencia e integración de un polinucleótido al cual está unida en otra molécula de ácido nucleico, tal como en un cromosoma de la 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%.

25 Cualquiera de tales secuencias y elementos asociados a la transformación pueden modificarse o mutarse para cambiar la eficiencia de transformación. Otras secuencias de polinucleótidos se pueden añadir a una secuencia de transformación de la presente descripción. Por ejemplo, puede ser modificarse para poseer múltiples sitios de clonación 5' y 3', o sitios de restricción adicionales. La secuencia de un sitio de escisión como se describe en la presente, por ejemplo, puede modificarse para aumentar la probabilidad de que la cadena principal de ADN del vector de acompañamiento no se integre en el genoma de la planta.

35 Cualquier polinucleótido deseado puede insertarse entre cualquiera de las secuencias de escisión o bordes descritas en la presente. Por ejemplo, un polinucleótido deseado puede ser un gen silvestre o modificado que es natural de una especie de planta, o puede ser un gen de un genoma no-vegetal. Por ejemplo, al transformar una planta de papa, se puede fabricar un casete de expresión que comprende un promotor específico de papa que se enlaza operativamente a un gen de la papa deseado o fragmento de este y un terminador específico de la papa. El casete de expresión puede contener elementos genéticos adicionales de la papa tal como un secuencia del péptido señal fusionada en el marco al extremo 5' del gen, y un potenciador transcripcional de la papa. La presente descripción no se limita a un arreglo de este tipo ni a un casete de transformación que puede fabricarse tal que el polinucleótido deseado, mientras se enlaza operativamente a un promotor, no se enlaza operativamente a una secuencia de terminador.

40 Adicionalmente a los elementos derivados de planta, tales elementos se pueden identificar además en, por ejemplo, hongos y mamíferos. Ver, por ejemplo sec. con núms. de ident.: 173-182. Varias de estas especies se han mostrado ya para ser accesibles a la transformación mediada por *Agrobacterium*. Ver Kunik y otros, Proc Natl Acad Sci USA 98: 1871-1876, 2001, y Casas-Flores y otros, Methods Mol Biol 267: 315-325, 2004..

50 Cuando una secuencia o elemento asociado a la transformación, tales como los descritos en la presente, se identifican y aíslan de una planta, y si esa secuencia o elemento se usa posteriormente para transformar una planta de la misma especie, esa secuencia o elemento puede describirse como "natural" al genoma de la planta.

55 Así, un elemento genético "natural" se refiere a un ácido nucleico que existe naturalmente en, se origina a partir de o pertenece al genoma de una planta que se debe transformar. En el mismo sentido, el término "endógeno" puede usarse también para identificar un ácido nucleico en particular, por ejemplo, ADN o ARN, o una proteína como "nativo" a una planta. Endógeno significa un elemento que se origina dentro del organismo. Así, cualquier ácido nucleico, gen, polinucleótido, ADN, ARN, ARNm, o molécula de ADNc que se aísla ya sea a partir del genoma de una planta o especies de planta que se debe transformar o se aísla de una planta o especies que es sexualmente compatible o interfértil con la especie de planta que se transforma, es "nativo" a, por ejemplo, autóctono de las especies de plantas. En otras palabras, un elemento

genético natural, representa todo el material genético que es accesible a los cultivadores de planta para el mejoramiento de las plantas a través del cultivo de planta clásico. Cualesquiera variantes de un ácido nucleico natural se consideran "naturales" también de acuerdo con la presente descripción. Con respecto a esto, un ácido nucleico "natural" puede aislarse de una planta o especies sexualmente compatibles de ella y modificarse o mutarse de manera que la variante resultante 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%, o 60% similar en la secuencia de nucleótidos al ácido nucleico no modificado, natural aislado de una planta. Una variante de ácido nucleico natural puede ser también menos que aproximadamente 60%, menos que aproximadamente 55%, o menos que aproximadamente 50% similar en la secuencia de nucleótidos.

Un ácido nucleico "natural" aislado de una planta puede codificar además para una variante del producto de proteína de origen natural transcrito y traducido de ese ácido nucleico. Por lo tanto, un ácido nucleico natural 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 la secuencia de aminoácidos a la proteína natural no modificada, expresada en la planta a partir de la cual se aisló el ácido nucleico.

En un constructo libre de terminador que comprende además dos copias del polinucleótido deseado, un polinucleótido deseado puede orientarse de manera que su secuencia es el complemento inverso de la otra. El diagrama esquemático de pSIM717 en la Figura 3 ilustra una disposición de este tipo. Esto es, la cadena "parte superior", "superior", o "sentido" del constructo puede comprender, en la dirección 5' a 3', (1) un fragmento de gen objetivo, y (2) el complemento inverso de un fragmento de gen objetivo. En este arreglo, un segundo promotor que se enlaza operativamente al complemento inverso del polinucleótido deseado producirá probablemente un transcrito de ARN que es al menos parcialmente idéntico en secuencia al transcrito producido a partir del otro polinucleótido deseado.

El polinucleótido deseado y su complemento inverso pueden estar separados por una secuencia de ADN espaciador, tal como un intrón, que es de cualquier longitud. Puede ser deseable, por ejemplo, reducir la posibilidad de transcribir la copia del complemento inverso del polinucleótido deseado a partir del promotor opuesto mediante la inserción de un intrón prolongado u otra secuencia de ADN entre el extremo 3' del polinucleótido deseado y el extremo 5' de su complemento inverso. Por ejemplo, en el caso de pSIM₇₁₇ (Figura 3) el tamaño del intrón ("I") se puede prolongar de manera que es poco probable que el complejo transcripcional de P1 alcance la secuencia del complemento inverso en gus-S antes de interrumpirse o desconectarse. En consecuencia, puede haber aproximadamente 50, 100, 250, 500, 2000 o más de 2000 nucleótidos posicionados entre las copias sentido y antisentido del polinucleótido deseado.

Un polinucleótido deseado de la presente descripción, por ejemplo, un "primer" o "segundo" polinucleótido como se describe en la presente puede compartir identidad de secuencia con toda o al menos parte de una secuencia de un gen estructural o elemento regulador. Por ejemplo, un primer polinucleótido puede compartir identidad de secuencia con una secuencia codificante o no codificante de un gen objetivo o con una porción de un promotor de gen objetivo. En una modalidad, el polinucleótido en cuestión comparte aproximadamente 100%, 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 elemento regulador objetivo, tal como un promotor objetivo.

Para facilidad, el término "polinucleótido deseado" solamente incluye otros términos usados en la presente descripción tales como "primer polinucleótido" y "segundo polinucleótido" o cualquier polinucleótido que se usa en un constructo de la presente invención para reducir la expresión de un gen o secuencia objetivo. Por lo tanto un "polinucleótido deseado" puede ser un primer o segundo polinucleótido o ambos.

En una forma más simple, un constructo de la presente descripción no contiene dos copias del polinucleótido sino sólo una copia. Como consecuencia, el polinucleótido se enlaza operativamente a los promotores tanto en su extremo 5' como 3'. En este arreglo en particular, los transcritos de ARN se producirán que comprenden secuencias de cada cadena del ADN bicatenario. Un ejemplo de este arreglo se muestra en la Figura 3 como pSIM772.

Un casete libre de terminador puede existir como una molécula de ADN extracromosómico en una célula o puede integrarse en cualquiera de una variedad de mecanismos en el núcleo, cromosoma, u otro ácido nucleico endógeno de la célula. Si el casete libre de terminador se integra de forma estable en el genoma de la célula, entonces puede ser posible producir una línea celular, cultivo celular, tejido biológico, planta u organismo que comprenda el casete en las generaciones posteriores de la célula u organismo.

La expresión de dicho constructo en una planta reducirá o evitará la expresión del(de los) gen(es) que se presentan ya sea identidad de secuencia o complementariedad inversa compartidas con al menos una parte de un polinucleótido deseado. La descripción no se limita por ninguna teoría o mecanismo en particular, pero los transcritos pueden, directa o indirectamente, afectar a la actividad de una secuencia reguladora, tal como un promotor, que normalmente está asociado con la expresión de un gen objetivo en una célula; o la transcripción puede afectar negativamente a la acumulación de un transcrito que se produce de forma endógena en la célula objetivo. Como consecuencia, ya sea la acumulación del transcrito o traducción del transcrito o ambas se pueden alterar por la actividad del transcrito 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, césped, maíz, arroz, avena, cebada, sorgo, orquídea, iris, lirio, cebolla, plátano, caña de azúcar, y palma. Alternativamente, la planta puede ser una planta dicotiledónea, por ejemplo, papa, tabaco, tomate, aguacate, pimienta, remolacha, brócoli, mandioca, papa dulce, algodón, flor de Pascua, legumbres, alfalfa, soja, guisante, haba, pepino, uva, brassica, zanahoria, fresa, lechuga, roble, arce, nogal, rosa, menta, calabacín, margarita, y cactus.

El efecto de la molécula de ARN, que se produce por un casete de expresión libre de terminador de la presente descripción, se puede evaluar midiendo, directa o indirectamente, el nivel de ácido nucleico o proteína objetivo en la célula o medio ambiente en la que está presente el casete de expresión. Así, el efecto de un casete de expresión de la presente descripción en la regulación negativa, supresión, reducción o prevención o eliminación de la expresión de genes objetivo se puede identificar mediante una reducción en la cantidad de transcrito de ARN que se produce por el gen objetivo, o una reducción en la cantidad de producto de proteína del gen objetivo, o ambos.

Un polinucleótido deseado de un constructo libre de terminador descrito en la presente puede ser idéntico a, o compartir identidad de secuencia con diferentes tipos de regiones de ADN, tales como (1) al menos parte de la secuencia que codifica un transcrito objetivo, (2) al menos parte del intrón de un gen que codifica un transcrito objetivo, (3) al menos una parte del promotor de un gen que codifica un transcrito objetivo, (4) parte del terminador de un gen que codifica un transcrito 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 las regiones se pueden mutar, modificar o sustituir para aumentar la identidad de secuencia con una secuencia objetivo o de cualquier otra forma para aumentar o mejorar el silenciamiento de la secuencia objetivo.

La ubicación de la secuencia objetivo, por lo tanto, puede estar en, pero sin limitarse a, (i) el genoma de una célula; (ii) al menos un transcrito de ARN que se produce normalmente en una célula; o (iii) en un plásmido, constructo, vector, u otro ADN o ARN vehículo. La célula que contiene el genoma o que produce el transcrito de ARN puede ser la célula de una bacteria, virus, hongo, levadura, mosca, gusano, planta, reptil, ave, pescado o mamífero.

Por lo tanto, el ácido nucleico objetivo puede ser uno que se transcribe normalmente en ARN a partir de un núcleo celular, que entonces se traduce a su vez en un polipéptido de codificación. Alternativamente, el ácido nucleico objetivo en realidad no se puede expresar en una célula o tipo de célula en particular. Por ejemplo, un ácido nucleico objetivo puede ser una secuencia de ADN genómico que reside en un núcleo, cromosoma, u otro material genético, tal como una secuencia de

ADN del ADN mitocondrial. Tal objetivo de ácido nucleico puede ser de, pero sin limitarse a, una región reguladora, una región no traducida de un gen, o una secuencia no codificante.

Alternativamente, el ácido nucleico objetivo puede ser foráneo a una célula huésped pero está presente o se expresa por un organismo no- huésped. Por ejemplo, un ácido nucleico objetivo puede ser la molécula de ADN o ARN endógena a, o expresada por, un parásito invasor, virus, o bacteria.

Además, el ácido nucleico objetivo puede ser una molécula de ADN o ARN presente o expresada por una célula de enfermedad. Por ejemplo, la célula de enfermedad puede ser una célula cancerosa que expresa una molécula de ARN que no se expresa normalmente en el tipo de célula no cancerosa.

En las plantas, el polinucleótido deseado puede compartir la identidad de secuencia con un ácido nucleico objetivo que es responsable de un rasgo particular de una planta. Por ejemplo, un polinucleótido deseado puede producir un transcrito que dirige y reduce la expresión de un gen objetivo de polifenol oxidasa en una planta y, por lo tanto, modifica uno o más rasgos o fenotipos asociados con la mancha negra por magulladura. Del mismo modo, un polinucleótido deseado puede producir un transcrito que dirige y reduce la expresión de un ácido nucleico objetivo R1 asociado al almidón o ácido nucleico objetivo de fosforilasa en una planta, modificando de este modo uno o más rasgos o fenotipos asociados con el endulzamiento inducido por el frío.

Un casete de expresión en un constructo de la presente descripción puede estar flanqueado por una o más secuencias bordes del ADN de transferencia ("ADN-T"). Cualquiera de los casetes de expresión descritos en la presente, por ejemplo, se pueden insertar en el ADN-T de un plásmido derivado de *Agrobacterium*, tal como un plásmido Ti de *A. tumefaciens*.

Una secuencia borde puede comprender una secuencia que es similar a una secuencia borde tradicional de ADN-T de *Agrobacterium*, pero en realidad es una secuencia que es natural en una planta, pero que puede facilitar la transferencia e integración de un ácido nucleico en otro. Por ejemplo, tales secuencias bordes de ADN de transferencia derivado de planta ("ADN-P") se pueden aislar de la papa (sec. con núm. de ident.: 44), tomate (sec. con núms. de ident.: 45-46), pimienta (sec. con núm. de ident.: 47), alfalfa (sec. con núm. de ident.: 48), cebada (sec. con núm. de ident.: 49), y arroz (sec. con núm. de ident.: 50) mostradas en la tabla secuencia en otra parte de esta solicitud.

Como consecuencia, cualquiera de los casetes de expresión descritos en la presente se pueden insertar en un ADN de transferencia que está delimitado por dichas secuencias bordes ADN-P, que son capaces de integrar el casete en otro ácido nucleico, tal como un genoma de planta o cromosoma de planta.

Como consecuencia, un plásmido de *Agrobacterium*, que contiene un casete de expresión descrito en la presente invención que no comprende una región de ADN implicada en la formación del extremo-3 y la poliadenilación de un transcrito de ARN, puede estar establemente integrado en el genoma de una planta a través de la transformación mediada por *Agrobacterium*. La progenie de la planta transformada, por lo tanto, continuará para expresar los transcritos asociados con el casete de expresión.

Los promotores que se usan para iniciar la transcripción del polinucleótido deseado pueden ser promotores constitutivos, preferidos del tejido, o inducibles o permutaciones de ellos. Promotores "fuertes", por ejemplo, incluyen los promotores de la ubiquitina-7 y ubiquitina-3 de la papa, y promotores de la ubiquitina del maíz, arroz y caña de azúcar. También incluyen el promotor de la actina de arroz, varios promotores de la subunidad pequeña de rubisco, promotores de la activasa de rubisco, y promotores de la actina del arroz. Buenos promotores preferidos de tejido que se expresan principalmente en los tubérculos de la papa incluyen los promotores de los genes de la sintasa de almidón unida al gránulo y ADP glucosa pirofosforilasa. Hay varios promotores inducibles, pero típicamente un promotor inducible puede ser un promotor sensible a la temperatura, un promotor químicamente inducido, o un promotor temporal. Específicamente, un promotor inducible puede ser un promotor Ha hsp17.7 G4, un promotor wcs120 de trigo, un promotor génico 16A Rab, un promotor génico de la [alfa] amilasa, un promotor génico pin2, o un promotor de la carboxilasa.

Como consecuencia, para facilitar la identificación de una planta que se ha transformado exitosamente con un casete de expresión libre de terminador, puede ser deseable incluir un marcador seleccionable o detectable dentro de la región delimitada por las secuencias bordes del ADN de transferencia. La inclusión de un marcador es un procedimiento estándar en la transformación mediada por *Agrobacterium* y se emplea para que sea posible identificar fácilmente el material vegetal transformado con éxito. En los casetes de expresión descritos en las Figuras 1-4, por ejemplo, el marcador es higromicina fosfotransferasa ("hptII"), que confiere resistencia a la higromicina en una planta que expresa ese marcador. En tales cassetes, por lo tanto, una región terminador o ADN que está involucrado en la formación del extremo-3 y la poliadenilación

de un transcrito de ARN se enlaza operativamente a la secuencia génica de hptII. Otros marcadores seleccionables y evaluables se pueden usar en lugar de hptII.

Ejemplos

Ejemplo 1

Constructos de silenciamiento convencionales

La eficacia de varios constructos de silenciamiento se probó mediante la orientación del gen reportero beta glucuronidasa (gus) enlazado operativamente al promotor constitutivo fuerte del virus de mosaico de escrofularia, denominado en el presente documento como "P1" (sec. con núm. de ident.: 1). Este sistema de prueba es riguroso debido a que la proteína gus es altamente estable. Así, sólo reducciones relativamente grandes en los transcritos de gus resultan en reducciones fenotípicamente detectables de los niveles de proteína gus. La mayoría de los constructos de silenciamiento contienen al menos una copia del mismo fragmento del gen gus de 304-pb (sec. con núm. de ident.: 2), ya sea en la orientación sentido o antisentido enlazado operativamente a un promotor constitutivo fuerte y en algunos casos, seguido por el terminador del gen nopalina sintasa de Agrobacterium. Los constructos de silenciamiento se insertaron a continuación de un casete de expresión para el gen marcador seleccionable de a higromicina fosfotransferasa (hptII) entre los bordes del ADN-T de los vectores de transformación. Se usaron vectores resultantes para retransformar una planta de tabaco que se transformó antes, con un ADN-T que contiene un casete de expresión para el gen gus (ver además las Figuras 1 y 2).

Los siguientes vectores de transformación se produjeron para estudiar el papel de un elemento terminador en los constructos de silenciamiento convencionales:

pSIM714: El vector control negativo pSIM714, que no contiene un constructo de silenciamiento.

pSIM718: Vector pSTM718, que contiene un fragmento del gen gus 'sentido' enlazado operativamente al terminador del gen nopalina sintasa (sec. con núm. de ident.: 3) que representa las estrategias descritas en, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos 5,283,184 y 5,231,020. Este vector contiene el fragmento del gen gus enlazado operativamente en la orientación sentido al promotor y seguido por el terminador.

pSIM140: Vector pSIM140, que es idéntico al pSIM718 excepto que el constructo de silenciamiento no contiene un terminador.

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

pSIM758: Vector pSIM758, que es idéntico a pSIM755 excepto que el constructo de silenciamiento no contiene un terminador.

pSIM374: Vector pSIM374, que contiene un constructo que contiene terminador que comprende tanto un fragmento del gen gus sentido como antisentido y representa las estrategias descritas en, por ejemplo, WO 99/53050A1. Este vector contiene dos copias del fragmento del gen gus, uno en la orientación de sentido y el otro en la orientación antisentido y separadas una de la otra por un intrón, representado en la sec. con núm. de ident.: 4, y se inserta entre el promotor y el terminador.

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

Vectores binarios que contienen los diversos constructos se introdujeron en Agrobacterium. Diluciones de diez veces de los cultivos crecidos durante la noche, se crecieron durante cinco a seis horas, precipitaron durante 15 minutos a 2,800 RPM, se lavaron con medio líquido MS (Phytotechnology, KS) suplementadas con sacarosa (3%, pH 5.7), y se resuspendieron en el mismo medio a OD/600 nm de 0.2. La suspensión se usó después para infectar explantes de hojas de la planta transgénica de Nicotiana tabacum (tabaco) crecida in vitro que expresa el gen gus. Los explantes infectados se incubaron durante dos días en medio de co-cultivo (sales MS 1/10, 3% de sacarosa, pH 5.7) que contienen 6 g/L de agar a 25[grad.]C en una cámara de crecimiento Percival (fotoperíodo de 16/8 hr) y transfirieron posteriormente a medio agar/M401

(PhytoTechnology) que contiene timentin (150 mg/L) e higromicina (20 mg/L). Los brotes resultantes se transfirieron a medio de raíz libre de hormonas, y tres hojas de cada planta resultante se tiñeron para la expresión de gus.

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

10 La Tabla 1 muestra además que los constructos que representan los tres métodos de silenciamiento convencionales diferentes inducen el silenciamiento del gen gus con diferentes eficiencias. De acuerdo con lo que se ha informado en la literatura, pSIM374 es más eficaz. Aproximadamente la mitad de las plantas que se retransformaron con este constructo muestran al menos algún nivel reducido de actividad de gus. Los otros dos constructos soportan una reducción de la actividad de gus en sólo aproximadamente 6% de las plantas retransformadas.

15 Es importante destacar que, la Tabla 1 demuestra también que la eliminación del terminador reduce drásticamente la eficacia de los constructos de silenciamiento. Por ejemplo, pSIM374 es más de seis veces más eficaz que su derivado libre de terminador, pSIM728. Casi ninguna actividad se observa con el pSIM758 libre de terminador.

20 Se puede concluir que el terminador juega un papel esencial en la optimización de la actividad de los constructos de silenciamiento convencionales.

Ejemplo 2

25 Silenciamiento de genes eficaz con constructos libres de-terminador que comprenden al menos dos copias de un fragmento del gen objetivo que induce la transcripción convergente.

Los siguientes vectores de transformación se produjeron para estudiar el efecto de la transcripción convergente en el silenciamiento de genes (ver además la Figura 3):

30 pSIM715: Vector pSIM715 contiene un constructo que comprende un primer segmento que consistente en el fragmento del gen gus enlazado operativamente al promotor (P1) y un segundo segmento en la orientación opuesta que consiste en el mismo fragmento del gen gus enlazado operativamente enlazado al promotor 35S constitutivos de virus mosaico de la coliflor, denominado 'P2' y representado en sec. con núm. de ident.: 5, mediante el cual el primero y segundo segmento están separados por dos intrones diferentes.

35 pSIM717: Vector pSIM717 es idéntico a pSIM715 excepto que los dos segmentos del constructo están separados por un único intrón.

pSIM789: Vector pSIM789 es idéntico a pSIM717 excepto que el promotor P2 se reemplaza por un promotor P1.

40 pSIM771: Vector pSIM771 es idéntico a pSIM717 excepto que el promotor P1 se reemplaza por el promotor de la ubiquitina-7 de la papa, que se representa en la sec. con núm. de ident.: 6 y se denomina en el presente documento 'P3'.

pSIM770: Vector pSIM770 es idéntico a pSIM717 excepto que el promotor P2 que conduce la expresión del gen marcador seleccionable se reemplaza por P1, y el promotor P1 del constructo de silenciamiento se reemplaza por P2.

45 pSIM772: Vector pSIM772 contiene el fragmento del gen gus insertado entre los promotores diferentes orientados de manera opuesta, P2 y P3.

50 pSIM756: Vector pSIM756 es idéntico a pSIM717 excepto que los fragmentos del gen gus se orientan en la orientación complementaria inversa respecto al promotor al que se unen inmediatamente.

pSIM779: Vector pSIM779 es un ejemplo de una repetición en tándem de fragmentos del gen gus insertado entre dos promotores convergentes.

55 pSIM787: Vector pSIM787 es similar como pSIM779 pero contiene cuatro repeticiones directas del fragmento de gen objetivo insertado entre promotores convergentes.

pSIM1111 es idéntico a pSIM779 excepto que las cuatro repeticiones directas están precedidas por un fragmento de ADN antisentido del gen *gus* que es diferente de la sec. con núm. de ident.: 2 y se representa como sec. con núm. de ident.: 7.

5 Ensayos *gus* realizados en las plantas re-transformadas con *gus* demuestran que todos los constructos libres de terminador probados que contienen dos segmentos, cada uno que contiene un promotor diferente conduciendo el fragmento del gen *gus*, en la orientación complementaria inversa, pSIM715, 717, y 756, 771 son más eficaces en el silenciamiento del gen *gus* que pSIM374, el constructo que representa el mejor enfoque convencional. Además, pSIM789 confiere además el silenciamiento de genes eficaz a muchos de los transformantes dobles,

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

15 El experimento demostró además que un constructo con dos repeticiones directas (pSIM780) indujo el silenciamiento de genes. Sin embargo, este arreglo no fue tan eficaz como la organización de repetición invertida de pSIM756 (Tabla 1). Además, cuatro repeticiones directas (pSIM787) son más eficaces que las dos repeticiones directas (Tabla 1).

20 Para estudiar la base molecular del silenciamiento libre de terminador, se aisló el ARN a partir de tres plantas que se retransformaron con pSIM717 y tres plantas adicionales retransformadas con pSIM715. En cada caso, una planta representó un evento silenciamiento ineficaz mientras que las otras dos plantas mostraron el silenciamiento del gen *gus* casi completo.

25 Las reacciones en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) se realizaron para estudiar la producción de transcritos a partir de los dos promotores diferentes usados en pSIM715 y pSIM717. El primer iniciador usado para estos experimentos (PG, se muestran en la sec. con núm. de ident.: 8) es específico para una secuencia del fragmento del gen *gus* y se aparea con los transcritos producidos a partir de cualquier cadena. El segundo iniciador se diseñó para aparearse con las secuencias intrón de sólo una de las cadenas (pIF, se muestra en la sec. con núm. de ident.: 9, se aparea con una secuencia de la región espaciadora derivada del intrón-GBSS de los transcritos producidos por el promotor P1, y PIR, que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 10, se aparea con los transcritos producidos por el promotor P2). Curiosamente, estos estudios demostraron que el constructo de las plantas no silenciadas 717-7 y 717-13 sólo contuvieron los transcritos producidos a partir de una de las dos cadenas, ya sea T1 o T2 (Figura 7). A diferencia, las plantas silenciadas 715-19, 715-38, 717-55, y 717-36 produjeron transcritos a partir de ambas cadenas (Figura 7). Así, el silenciamiento eficaz se lleva a cabo sólo si ambos promotores del constructo son funcionalmente activos simultáneamente.

35 La posterior hibridación de membranas de transferencia de gel de ARN con sondas marcadas radiativamente derivadas del gen *gus* demostró que el silenciamiento eficaz en 715-38, 715-55, 717-12, 717-36, 717-19 se correlaciona con una fuerte disminución en la acumulación de ARN *gus* (Figura 8). Además, los transcritos producidos por el constructo de silenciamiento en las plantas totalmente silenciadas se encontraron que variaron generalmente en tamaño de aproximadamente 0.2-kb a aproximadamente 1.0 kb (Figura 8). Aunque RT-PCR reveló la presencia de grandes transcritos adicionales que comprenden no sólo el polinucleótido sino también las secuencias del promotor corriente abajo, la presencia de tales transcritos apenas se pudieron detectar en las membranas de transferencia de gel de ARN. Por ejemplo, la hibridación con una sonda derivada a partir del promotor P1 necesitó un tiempo de exposición de siete días antes de que se pudiera observar un frotis muy débil.

45 Ejemplo 3

Silenciamiento en los tubérculos de papa

50 Varios vectores se desarrollaron para probar el concepto de silenciamiento libre de terminador en los tubérculos. Estos vectores contienen un casete de expresión para el gen neomicina fosfotransferasa (*nptII*) como sistema marcador seleccionable (ver además la Figura 6). Los promotores del conductor usados para el silenciamiento de genes en los tubérculos de papa se seleccionaron del grupo consistente de: (1) el promotor fuerte de la ubiquitina-7 de la papa, (2) el gen del promotor fuerte del tubérculo y específico a estolón de la sintasa de almidón unida al gránulo (GBSS) (sec. con núm. de ident.: 12), y (3) el gen del promotor fuerte específico al tubérculo de la pirofosforilasa de la ADP glucosa de la papa (AGP) (sec. con núm. de ident.: 13). Ver Figura 4 para los mapas de los ADN de transferencia.

pSIM764: Vector pSIM764 contiene un constructo de 'silenciamiento de tubérculo' que comprende un primer segmento que

consiste en el remolque de 154 pb del gen PPO expresado en el tubérculo de la papa (sec. con núm. de ident.: 14) enlazado operativamente al promotor GBSS y un segundo segmento en la orientación opuesta que consiste en el mismo fragmento de remolque enlazado operativamente al promotor GBSS mediante el cual el primero y segundo segmento están separadas por el intrón del gen ubiquitina-7 de la papa representado en la sec. con núm. de ident.: 15.

pSIM765: Vector pSIM765 Vector pSIM765 es idéntico a pSIM764 la excepción de que los fragmentos de gen PPO se orientan en la orientación opuesta.

pSIM217 representa el plásmido de control y contiene las dos copias del gen PPO insertado como repetición invertida entre el promotor GBSS y los terminadores de la ubiquitina.

Diluciones de diez veces de los cultivos crecidos durante la noche, se crecieron durante 5-6 horas, precipitaron durante 15 minutos a 2,800 RPM, se lavaron con medio líquido MS (Phytotechnology) suplementadas con sacarosa (3%, pH 5.7), y se resuspendieron en el mismo medio a 0.2 OD/600 nm. Las células resuspendidas se mezclaron y usaron para infectar segmentos internodales de 0.4-0.6 mm de la variedad de papa "Ranger Russet". Los tallos infectados se incubaron durante dos días en medio de co-cultivo (sales MS 1/10, 3% de sacarosa, pH 5.7) que contiene 6 g/L de agar a 22[grad.]C en una cámara de crecimiento Percival (16 horas de luz) y transfirieron posteriormente al medio de inducción de callos (CIM, medio MS suplementado con 3% de sacarosa 3, 2.5 mg/L de ribósido de zeatina, 0.1 mg/L de ácido acético naftaleno, y 6 g/L de agar) que contiene timentin (150 mg/L) y kanamicina (100 mg/L). Después de un mes de cultivo en CIM, los explantes se transfirieron al medio de inducción de brote (SIM, medio MS suplementado con 3% de sacarosa, 2.5 mg/L de ribósido de zeatina, 0.3 mg/L de ácido giberélico GA3, y 6 g/L de agar) que contiene timentin y kanamicina (150 y 100 mg/L, respectivamente) hasta que surgieron los brotes. Los brotes que se originaron al final del período de regeneración se transfirieron al medio MS con 3% de sacarosa, 6 g/L de agar y timentin (150 mg/L). Las plantas transgénicas se transfirieron al suelo y se colocaron en una cámara de crecimiento (11 horas de luz, 25[grad.]C). Después de tres semanas, al menos 3 minitubérculos/línea se ensayaron para la actividad de la PPO. Para este propósito, 1 g de tubérculos de la papa se pulveriza en nitrógeno líquido, se añade a 5 ml de 50 mM de tampón MOPS (3- (N-morfolino) propano-ácido sulfónico) (pH 6.5) que contiene catecol 50 mM, y se incuba a temperatura ambiente con rotación durante aproximadamente 1 hora. La fracción sólida se precipitó, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo para determinar la actividad de la PPO. Para este propósito, se pulverizó 1 g de tubérculos de la papa en nitrógeno líquido. Este polvo se añadió después a 5 ml de 50 mM de tampón MOPS, ácido (3-(N-morfolino) propano-sulfónico) (pH 6.5) que contiene 50 mM de catecol, e incubó a temperatura ambiente con rotación durante aproximadamente 1 hora. La fracción sólida se precipitó después, y se transfirió el sobrenadante a otro tubo para determinar la actividad de la PPO midiendo el cambio de OD-410 con el tiempo. El experimento demostró que pSIM764 y 765 indujo el silenciamiento efectivo en tubérculos de la papa (Tabla 2). Una comparación con los datos presentados en WO 2003/069980 demuestra que el método de la presente invención puede ser más eficaz que el de silenciamiento génico basado en terminador convencional como se ejemplifica por pSIM217, el control de la PPO.

Ejemplo 4

Silenciamiento multi-gen en el tabaco

Dos constructos se crearon para estudiar el efecto de la posición de los fragmentos de genes dentro del constructo de silenciamiento. Para este propósito, las dos copias del fragmento del gen *gus* de pSIM771 se reemplazaron por dos copias del fragmento del gen *gus* enlazados a un fragmento del gen polifenol oxidasa del tabaco (PPO) (sec. con núm. de ident.: 16) (además, ver la Figura 6):

pSIM774: Vector pSIM774 contiene un constructo de silenciamiento con los fragmentos del gen *gus* inmediatamente enlazados a los promotores y fragmentos del gen PPO adyacentes enlazados al intrón central.

pSIM775: Vector pSIM775 contiene un constructo de silenciamiento con los fragmentos del gen PPO inmediatamente enlazados a los promotores y fragmentos del gen PPO adyacentes enlazados al intrón central.

Se espera la retransformación de las plantas *gus* con estos vectores para inducir el silenciamiento tan eficientemente como pSIM771.

Ejemplo 5

Silenciamiento multi-gen en la papa

El silenciamiento génico múltiple se implementa dirigiendo simultáneamente tres genes indeseables de los tubérculos de la papa.

5 El plásmido pSIM1121 (Russet Boise II) comprende un ADN de transferencia completamente natural representado en la sec. con núm. de ident.: 17 que comprende un constructo de silenciamiento que comprende dos copias de un segmento de ADN, separados por el intrón del gen ubiquitina-7 de la papa y ubicado como repetición invertida entre dos promotores GBSS convergentes, por lo que el segmento de ADN comprende (i) un fragmento del remolque del gen polifenol oxidasa expresada en el tubérculo de la papa silvestre relacionada a *Solanum verrucosum* Schltdl. TRHRG193, número de acceso 498062 (ver: USDA, ARS, Programa Nacional de Recursos Genéticos. Red de Información de Recursos de Germoplasma - (GRIN). [Base de datos en línea] Laboratorio Nacional de Recursos de Germoplasma, Beltsville, Maryland. disponible en: <http://www.ars-grin.gov2/cgi-bin/npgs/html/acchtml.pl?1392998>, 12 septiembre de 2005) (sec. con núm. de ident.: 18) (ii) un fragmento de la líder del gen fosforilasa L (sec. con núm. de ident.: 19), y (iii) un fragmento de la líder del gen R1 (sec. con núm. de ident.: 20).

15 El empleo de este plásmido permite producir plantas de la papa transformadas que sólo contienen ADN natural y muestra las siguientes nuevas características: (1) tolerancia a la magulladura debido al silenciamiento del gen PPO expresado en el tubérculo, (2) acumulación reducida de glucosa inducida por el frío debido al silenciamiento de los genes de la fosforilasa y R1.

20 Ejemplo 6

Promotor objetivo altamente efectivo

25 Los siguientes vectores de transformación se produjeron para demostrar que las secuencias del promotor objetivo se pueden usar para silenciar la expresión del gen objetivo (ver también la Figura 4):

30 pSIM773: Vector pSIM773 contiene un constructo que comprende un primer segmento que comprende el promotor P3 vinculado a P1, y un segundo segmento, que se orienta en la orientación opuesta, y que comprende el P2 enlazado a P1. El primero y segundo segmento están separados por un intrón. Así, este constructo contiene cuatro promotores funcionalmente activos. Los dos promotores en el medio son idénticos, representan el promotor objetivo, y están en orientación convergente. Los dos promotores exteriores son diferentes entre sí y están en orientación convergente. Todos los cuatro promotores contienen una caja TATA y proceden de un par de bases corriente arriba a partir del inicio de la transcripción.

35 pSIM1101: Vector pSIM1101 es idéntico a pSIM773 excepto que el promotor P3 se reemplazó por el terminador nos.

40 pSIM788: Vector pSIM788 es similar a pSIM773 excepto que los dos promotores P1 centrales del gen *gus* objetivo sólo contienen secuencias corriente arriba a partir de la caja TATA, (sec. con núm. de ident.: 21), representando así los promotores no funcionales.

pSTM1120: Vector pSIM1120 es similar a pSIM773 excepto que los dos promotores centrales del gen objetivo carecen de una caja TATA y no están en orientación convergente sino divergente.

45 pSIM1112: Vector pSIM1112 contiene un único promotor P1 no funcional insertado entre el promotor P2 y P3 convergente.

pSTM1113: Vector pSTM1113 contiene dos promotores P1 convergentes separados por un intrón.

pSTM754: Vector de control pSIM754 contiene el promotor P1 que controla la expresión del promotor P2, y viceversa.

50 La retransformación de las plantas *gus* con pSIM773 rindió 35 plantas resistentes a higromicina. El análisis por PCR confirmó la presencia del ADN de transferencia de pSIM773. Sorprendentemente, la tinción *gus* posterior reveló un silenciamiento completo extremadamente eficaz del gen *gus* (Tabla 1). Veinte plantas (57%) no mostraron ninguna expresión *gus* detectable. Así, el promotor objetivo usando la estrategia de pSIM773 es altamente deseable.

55 Se obtuvieron resultados similares con los promotores objetivo en la orientación divergente insertados entre dos promotores del conductor convergentes, con el 77% de las plantas que se retransformaron con pSIM1120 que presentan silenciamiento génico total de *gus* (Tabla 1).

La Tabla 1 muestra que el silenciamiento génico se llevó a cabo también mediante el uso de un único promotor objetivo insertado entre dos promotores del conductor convergentes (pSIM1112). Sin embargo, este método puede ser menos eficaz que los métodos que emplean dos copias del promotor objetivo orientados como repetición invertida.

Además, la eficacia de pSIM1113 demuestra que los promotores del conductor no son siempre necesarios. Es posible silenciar eficazmente un gen mediante el empleo simple dos promotores objetivo convergentes (Tabla 1).

La mayoría (44%) de las plantas que se retransformaron con pSIM1101 mostraron también silenciamiento génico completo (Tabla 1). Este hallazgo demuestra que el silenciamiento basado en promotores no requiere la transcripción convergente.

Se han encontrado frecuentemente métodos convencionales de silenciamiento que no proporcionan silenciamiento génico estable en las generaciones posteriores. A diferencia, los constructos de cuatro promotores representados por pSIM773 dieron lugar al silenciamiento completo que se mantiene completamente después de la transmisión del casete de silenciamiento a la generación siguiente. La estabilidad mejorada se demostró dejando madurar las plantas de tabaco transformadas dobles, y determinando posteriormente los niveles de expresión de gus en las progenies T1. Este estudio mostró que el 100% de las plantas de la progenie que se derivaron de una planta pSIM773 y contuvieron tanto el gen gus como el casete silenciar mostraron el silenciamiento génico completo de gus (Tabla 3). A diferencia, ninguna de las plantas T1 que portan el gen gus y el casete de silenciamiento pSIM374 mostró el silenciamiento génico completo de gus (Tabla 3). Se observó un fenotipo intermedio mediante el análisis de la progenie de una planta que porta el gen gus y el cassette de silenciamiento de pSIM717 (Tabla 3).

Ejemplo 7

Requisitos de la secuencia del promotor objetivo.

Los experimentos anteriores demostraron que las secuencias de promotor se pueden usar para inducir eficazmente el silenciamiento génico. Sin embargo, no debe entenderse que significa que cualquier fragmento del promotor del gen objetivo puede emplearse para este propósito.

Para estudiar los requisitos de la secuencia para el silenciamiento a base de promotor, se crearon dos vectores que comprenden dos copias de sólo una parte del promotor P1 insertado como repetición invertida entre los promotores del conductor.

PSIM1118: Vector pSIM1118 contiene dos copias de un fragmento de 300 pb corriente arriba del promotor que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 11.

pSIM1119: Vector pSIM1119 contiene dos copias de una región central de 300 pb del promotor P1 que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 51.

La retransformación de las plantas gus con los dos constructos diferentes rindió 34 y 20 plantas, respectivamente, que se analizaron histológicamente. Curiosamente, ninguna de las plantas analizadas mostraron ninguna expresión de gus reducida, lo que indica que los fragmentos de promotor empleados no indujeron eficazmente el silenciamiento génico (Tabla 1).

La Figura 9 muestra un análisis de secuencia de varios fragmentos del promotor. El fragmento que facilita el silenciamiento génico eficaz está presente en pSIM773, 788, 1101, y 1120, pero no en pSIM1118 y 1119.

Ejemplo 8

Reducción del endulzamiento por frío en tubérculos de plantas de papa que contienen unos constructos de silenciamiento que comprenden dos copias de un fragmento del promotor del gen R1.

La secuencia del promotor del gen R1 asociado al almidón de la papa, incluyendo la líder y el codón de iniciación, se muestra en la sec. con núm. de ident.: 22. Dos copias de un fragmento promotor R1 corto (342-bp) (sec. con núm. de ident.: 23) se insertaron como repetición invertida ya sea entre dos promotores convergentemente orientados del promotor GBSS (en el plásmido pSIM1038) o un promotor GBSS y AGP en la orientación convergente (en el plásmido pSIM1043). Se usaron los vectores binarios resultantes para producir las plantas de la papa transformadas. Estas plantas se les dejará

desarrollar los tubérculos, y los tubérculos se almacenarán durante aproximadamente un mes o más a 4 [grad.]C. El análisis de glucosa de los tubérculos almacenados en frío demostrará que las plantas transformadas acumulan menos glucosa que las plantas control no transformadas. La acumulación reducida de glucosa disminuirá la formación de color durante el procesamiento de papas fritas y, por lo tanto, permitirá reducir el tiempo de blanqueo y preservar más del sabor original de la papa. Además, el silenciamiento génico R1 mediado por el promotor limitará la fosforilación del almidón y, por lo tanto, reducirá los problemas ambientales relacionados con la liberación de aguas residuales que contienen almidón de la papa. Otros beneficios de los tubérculos transformados incluyen: (1) las papas fritas resultantes contendrán cantidades más bajas del compuesto tóxico de acrilamida, que se forma a través de una reacción entre la glucosa y asparagina, y (2) las papas fritas resultantes mostrarán un fenotipo más crujiente, según se evaluó por paneles sensoriales profesionales, debido a la estructura ligeramente alterada del almidón.

Resultados similares se pueden obtener empleando una parte más corta (151 pb) del promotor R1, mostrado en la sec. con núm. de ident.: 24. El vector binario PSIM1056 comprende dos copias de este fragmento insertado como repetición invertida entre dos promotores GBSS orientados convergentemente; pSIM1062 comprende los fragmentos insertados entre promotores GBSS y AGP orientados de forma convergente. Este vector se usó para producir 25 plantas transformadas, que se pueden mostrar que presentan acumulación de glucosa inducida por el frío reducida y todos los beneficios asociados con ese rasgo.

Ejemplo 9

Tolerancia mejorada a la mancha negra por magulladura en tubérculos de plantas de papa que contienen un constructo de silenciamiento que comprende dos copias de un fragmento del promotor del gen polifenol oxidasa

La secuencia del promotor del gen polifenol oxidasa expresada en el tubérculo de la papa se muestra en la sec. con núm. de ident.: 25. Dos copias de un fragmento del promotor de la PPO de 200 pb (sec. con núm. de ident.: 26) se inserta como repetición invertida entre los promotores GBSS y AGP convergentes. Un vector binario que comprende este constructo de silenciamiento, designado pSIM1046, se usó para producir veinticinco plantas de papa transformadas. Las plantas se pueden dejar que desarrollen tubérculos, y los tubérculos se pueden ensayar para la actividad de la polifenol oxidasa. Este análisis mostrará que el nivel de expresión del gen PPO objetivo se reduce si se compara con los niveles de los controles no transformados.

De una manera similar, el plásmido pSIM1045, que contiene dos copias de un fragmento del promotor de la PPO de 460 pb (sec. con núm. de ident.: 27) insertados entre los promotores GBSS y AGP convergentes, se puede usar para disminuir la expresión del gen PPO.

Estrategias similares se pueden usar en otras especies de cultivo para limitar la magulladura. Por ejemplo, el promotor del gen PPO expresado en hoja de lechuga se puede usar para reducir la magulladura en las hojas de la lechuga, el promotor del gen PPO expresado en la fruta de la manzana se puede usar para reducir la magulladura en la fruta de la manzana, y el promotor del gen PPO expresado en semillas de trigo se puede usar para reducir la magulladura en los granos de trigo. En todos estos y otros casos, el promotor se puede aislar expresamente mediante el diseño de iniciadores que se aparean con las secuencias de genes de la PPO conocidos, y la realización de los métodos de aislamiento de ADN bien conocidos, tal como la RCP inversa.

Ejemplo 10

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

La secuencia del promotor del gen Fad2 de Brassica, incluyendo la líder, el intrón, y el codón de iniciación, se muestra en la sec. con núm. de ident.: 28. Dos copias de un fragmento de este promotor desprovisto de cualquiera de las secuencias transcritas tal como el fragmento de 441-pb que se muestran en la sec. con núm. de ident.: 29 se pueden ubicar como repetición invertida entre dos promotores orientados convergentemente que se expresan en las semillas de Brassica. Ejemplos de promotores 'del conductor' son: el promotor de un gen nabo (1.7s gen de la proteína de almacenamiento de la semilla) se muestra en la sec. con núm. de ident.: 30 o el promotor de un gen estearoil-ACP desaturasa (sec. con núm. de ident.: 31).

El casete de silenciamiento se puede ubicar dentro de la secuencia de ADN de transferencia de un vector binario, y este

vector binario se puede usar para transformar Brassica. Algunas de las plantas resultantes producirán semilla que contiene cantidades aumentadas de ácido oleico.

Otros promotores que pueden usar en los constructos de silenciamiento para mejorar la composición de aceite en cultivos de semillas oleaginosas tales como canola, frijol de soja, algodón y girasol incluyen promotores de otros genes de la vía de biosíntesis de los ácidos grasos. Por ejemplo, un promotor de una desaturasa de ácido graso objetivo 12, o desaturasa de ácido graso omega-6 microsomal, gen (FAD12) (por ejemplo, núm. de acceso al Genbank. AF243045 para la canola y AB188250 para el frijol de soja) tal como el promotor de FAD12 del frijol de soja que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 32 se puede usar para aumentar los niveles de ácido oleico en cultivos tales como la canola y el frijol de soja.

Además, los promotores de los genes de la proteína estearoil-acil-portadora delta 9-desaturasa del algodón y oleoil-fosfatidilcolina omega 6-desaturasa se pueden usar para aumentar los niveles de ácido esteárico y oleico, respectivamente, en el algodón. Este promotor se puede identificar mediante la realización de métodos tal como RCP inversa usando la secuencia conocida de los genes objetivo (Liu y otros, Plant Physiol 129:1732-43, 2002). Dos copias del promotor recién aislado se pueden usar después en estrategias similares a las que se muestran por pSIM773 por medio del cual los promotores 'del conductor' específicos de la semilla pueden representar ya sea el ADN foráneo o ADN natural.

Ejemplo 11

Reducción del contenido de lignina en el sistema vascular de las plantas de alfalfa que contienen un constructo de silenciamiento que comprende dos copias de unos fragmentos del promotor de gen Comt

El promotor del gen Medicago sativa (alfalfa) ácido cafeico/ácido 5-hidroxiferulico 3/5-O-metiltransferasa (COMT), incluyendo la líder, se muestra en sec. con núm. de ident.: 33.

Dos copias de un fragmento del promotor de 448 pb desprovisto de secuencias transcritas (sec. con núm. de ident.: 34) se insertaron como repetición invertida entre dos promotores del conductor orientados convergentemente. El primer promotor del conductor es el promotor del gen petE que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 35; el segundo promotor es el promotor del gen Pal que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 36. Un vector binario que comprende este constructo de silenciamiento, designado pSIM1117, se usó para producir veinticinco plantas de alfalfa transformadas. Tejidos del tallo de las plantas se ensayaron y mostraron que contienen niveles reducidos de lignina.

La reducción del contenido de lignina puede determinarse de acuerdo con el siguiente protocolo: (i) cortar las secciones de tallo y colocarlas en el vidrio de reloj, (ii) sumergir los tallos cortados en permanganato de potasio al 1 % durante 5 minutos a temperatura ambiente, (iii) descartar la solución de permanganato de potasio usando una pipeta desechable y lavar las muestras dos veces con agua para eliminar el exceso de permanganato de potasio, (iv) añadir HCl al 6% (V/V) y dejar que el color de las secciones se torne de negro o marrón oscuro a marrón claro, (v) si es necesario, añadir HCl adicional para facilitar la eliminación de color oscuro, (vi) descartar el HCl y lavar las muestras dos veces con agua, (vii) añadir unas gotas de solución de bicarbonato de sodio al 15% (algunas veces puede no ir en la solución por completo), un color rojo oscuro o rojo-púrpura se desarrolla en las maderas duras (mayor en las unidades S) y de color marrón en la madera blanda (mayor en unidades G).

Diecinueve líneas de alfalfa transformadas se probaron para el contenido de lignina reducido, y se encontraron seis plantas que acumulan cantidades reducidas de la unidad-S de la lignina.

En lugar del promotor del gen COMT, es posible usar también el promotor del gen cafeoil CoA 3-O-metiltransferasa (CCOMT). La secuencia de este promotor, junto con la líder corriente abajo, se muestra en la sec. con núm. de ident.: 37. Un fragmento de la sec. con núm. de ident.: 29 desprovisto de secuencias transcritas como se representa en la sec. con núm. de ident.: 38 se puede usar para reducir el contenido de lignina.

Del mismo modo, la lignina se puede reducir en los árboles mediante el uso de promotores de genes implicados en la biosíntesis de la lignina. Es posible usar además la sec. con núm. de ident.: 59 y reducir el contenido de lignina en el maíz empleando el enfoque de silenciamiento basado en el promotor anteriormente descrito.

Ejemplo 12

Aumento de la vida útil de los frutos de plantas de tomate que contienen un constructo de silenciamiento que comprende dos copias de un fragmento del promotor del gen poligalacturonasa

Un promotor de un gen poligalacturonasa objetivo tal como el promotor de tomate que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 39 se puede usar para reducir la descomposición de la pectina, disminuyendo así la degradación de la pared celular, retrasando el reblandecimiento, mejorando las características de viscosidad, y aumentando la vida útil en el tomate mediante la inserción de dos copias del fragmento de promotor como repetición invertida entre los promotores del conductor convergentes específicos de la fruta.

Ejemplo 13

Reducción de la alergenicidad de 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 alérgeno de la manzana Mal d 1 puede aislarse mediante el empleo de métodos de RCP inversa usando la secuencia del gen conocida (Gilissen y otros, J Allergy Clin Immunol 115:364-9, 2005), y este promotor se puede usar después para desarrollar variedades de manzanas que contienen niveles de alergenicidad más bajos.

Del mismo modo, el promotor del alérgeno principal del cacahuete Ara h 2 (Dodo y otros, Curr Allergy Asthma Rep 5, 67-73, 2005) puede aislarse usando métodos de RCP inversa, y se usa para desarrollar variedades del cacahuete que contienen niveles más bajos de alergenicidad.

Además, el promotor del alérgeno principal del frijol de soja Gly m Bd 30 K (Herman y otros, Plant Physiol 132, 36-43, 2003) puede aislarse usando métodos de RCP inversa, y se usa para desarrollar variedades de cacahuete que contienen niveles más bajos de alergenicidad.

Ejemplo 14

Aproximación de silenciamiento basada en una combinación de fragmentos del gen y promotor

El plásmido pSIM870 (Russet Boise III) comprende un ADN de transferencia todo natural representado en la sec. con núm. de ident.: 40 que comprende (1) un primer casete de silenciamiento que comprende dos copias de un segmento de ADN ubicado como repetición invertida entre dos promotores GBSS convergentes mediante el cual el segmento de ADN comprende (i) un fragmento del remolque del gen polifenol oxidasa expresada en tubérculo de Solanum verrucosum, (ii) un fragmento de la líder del gen fosforilasa L, y (iii) un fragmento del remolque del gen fosforilasa L (sec. con núm. de ident.: 41), y (2) un segundo casete de silenciamiento que comprende dos copias del promotor R1 ubicado como repetición invertida entre los promotores del conductor de los genes AGP y GBSS, respectivamente.

El plásmido pSIM899 (Russet Boise IV) comprende un ADN de transferencia todo natural representado en la sec. con núm. de ident.:42 que comprende un primer casete de silenciamiento que comprende dos copias de un segmento de ADN ubicado como repetición invertida entre dos promotores GBSS convergentes mediante el cual el segmento de ADN comprende (i) un fragmento del remolque del gen polifenol oxidasa tubérculo-expresado de Solanum verrucosum, y (ii) un fragmento de la líder del gen fosforilasa L, y un segundo casete de silenciamiento que comprende cuatro copias del líder del gen R1 enlazado operativamente al promotor de AGP y seguido por una repetición invertida que comprende un fragmento sentido y antisentido del gen R1.

La transformación de la papa con cualquiera de estos tres plásmidos producirá plantas que, en comparación con las plantas no transformadas, muestra las siguientes características: (1) expresión reducida del gen polifenol oxidasa expresado en tubérculo y, como consecuencia, (i) el contenido aumentado de polifenol del tubérculo como se puede determinar por xx, y (ii) la tolerancia mejorada a la mancha negra por magulladura del tubérculo como se puede determinar por xx, y (2) la expresión fuertemente reducida de la fosforilasa y genes R1 y, como consecuencia, (i) la fosforilación de almidón reducida y, como consecuencia, el contenido de fosfato disminuido de aguas residuales que contienen almidón de la papa, y (ii) una conversión reducida de almidón en glucosa durante el almacenamiento en frío como se determina usando el reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa (Megazyme, Irlanda), resultando en (a) menos caramelización y, como consecuencia, la formación reducida de color durante la fritura, lo que hace posible almacenar a altas temperaturas y/o el blanqueo durante periodos de tiempo más cortos (b) menos formación de acrilamida, y (c) aumento de la capacidad crujiente de las papas fritas.

Ejemplo 15

Intrón objetivo

El polinucleótido usado para generar un constructo TFCT puede contener el intrón de un gen que produce el transcripto objetivo. El concepto de silenciamiento dirigido al intrón se puede demostrar usando el intrón del gen gus que se expresa en tabaco transgénico.

El siguiente vector de transformación se produjo para demostrar que secuencias del intrón objetivo se pueden usar para silenciar la expresión del gen objetivo (ver además la Figura 5):

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

Un ejemplo de un intrón que se puede usar para silenciar un gen es el intrón del gen R1 asociado al almidón de *Solanum vernei* de sec. con núm. de ident.: 44. El silenciamiento génico de R1 reducirá el grado de endulzamiento inducido por el frío en los tubérculos durante el almacenamiento.

Ejemplo 16

Terminador objetivo

El polinucleótido usado para generar un constructo TFCT puede contener secuencias corriente abajo de las secuencias de un gen objetivo. Este concepto se puede demostrar usando las secuencias corriente abajo del gen gus que se expresa en el tabaco transgénico.

Ejemplo 17

Reducción del contenido de lignina en el sistema vascular de las plantas de alfalfa que contienen un constructo de silenciamiento que comprende dos copias de un fragmento del gen Comt

Un vector binario designado pSTM856 se ensambló que comprende un casete de expresión que comprende dos fragmentos de genes Comt representados en las sec. con núms. de ident: 52 y 53, ubicado como repetición invertida entre dos promotores convergentes de la alfalfa mostrados en las sec. con núms. de ident.: 54 y 55 de tal manera que los promotores están enlazados operativamente al primer fragmento antisentido y después al fragmento sentido. El casete de expresión se inserta entre las secuencias derivadas de alfalfa que funcionan como reemplazo para los bordes de *Agrobacterium* y se muestran en las sec. con núms. de ident.: 56 y 57. El ADN de transferencia entero, representado en la sec. con núm. de ident.: 58 se inserta en un plásmido que lleva un casete de expresión para el gen ipt de *Agrobacterium* en su cadena principal.

Las transformaciones se llevaron a cabo como se describe en Weeks y Rommens, solicitud de patente de los Estados Unidos US20050034188A1. Dos plantas transformadas se probaron para el contenido de lignina, y en ambas se encontraron que no se acumula visiblemente la unidad-S.

TABLAS

Tabla 1. Eficacia de los constructos de silenciamiento convencionales y libre de terminador.

Constructo para la 2 ^{da} transformación.	Plantas de tabaco ensayadas	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
PSM770	38	35 (92%)	3 (8%)	0	0
PSIM771	35	20 (57%)	3 (9%)	9 (26%)	3 (9%)
PSM772	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%)

PSIM1101	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%)
PSIM1118	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 la PPO en minitubérculos de la papa. 'wt' = plantas silvestres no transformadas; '401' = plantas transformadas que portan un ADN de transferencia que comprende sólo un casete de expresión para el gen marcador seleccionable nptII, 'OD' = medición a OD260, 'S.E.' = error estándar.

ES 2 534 426 T3

	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
5	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	0.167	112	2.4
	wt-8	0.149	0.165	0.152	105	2.7
10	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
15	pSIM784	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
20	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
25	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
30	10	0.081	0.073	0.077	52	1.3
	11	0.059	0.061	0.052	39	1.5
	12	0.056	0.046	0.053	35	1.5
35	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
40	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	3.8
45	19	0.045	0.049	0.041	30	1.3
	20	0.061	0.051	0.048	38	2.2
	21	0.043	0.039	0.039	27	0.7
50	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
55	28	0.044	0.042	0.042	29	0.4
	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	0.082	0.067	0.063	43	0.8
39	0.048	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

Líneas Parental	PCR positiva para el gen gus y constructo de silenciamiento	Parcialmente silenciada	Completamente silenciada
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

Sec. núm. ident.:	con de	NAMEI (si hay)	Secuencia
1		Promotor EMV ('P1')	ATTAGGAGCATTCCAGATTGGGTTCATCAACAAGGTACGAGCCATATCA CTTTATTCBAATTGGTATCGCCAAAACCAAGAGGAACTCCCATCCTCAAA GGTTTGTAAGGAGGATTTCTCAGTCCAAAGCCTCAACAGGTCAAGGTACA GAGTCTCCAAACCATTAGCCAAAAGCTACAGGAGATCAATGAAGAACTTC AATCAAGATAAAGTACTGTCCAGCACATGATCATGGTCAGTAAGTTTCA GAAAAAGACATCCACCGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCATCTTGAAGATA TCTTGTCAACATCGAGCAGCTGGCTTGTGGGGACCAGACAAAAGGAATG GTGCAGAAATGTAGGCGCACCTACCAAAAGCATOTTTGCCCTTTATGCCAA AGATAAAGCAGATTCTCTAGTACAAAGTGGGGAACAAAATACCTGGAAAA GAGCTGTCCTGACAGCCCATCTCACTAATGCGTATGACGAAACGAGTGACGA CCACAAAAGAAATTCCTCTATATAAGAGGCAATTCATTCGCATTGGAAGGA TCATCAGATACTCAACCAAT
2		fragmento del gen gus de 304-pb	CAACGCTAAACTCGACCGGACGCGTCCGATCAGCTGCGTCAATGTATGT TCTGCGACGCTACACCGATACCATCAGCGATCTCTTGTATGTGTGTGCC TGACCCGTTATTAAGGATGGTATGTCCAAAGCGCGATTTGGAAACGGCAG AGAAAGGTACTGGAAAAGAACTTCTGGCCTGGGAGGAGAACTGCATCAGC CGATTATCATCAGCAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGCTGCATCAG TGTACACCGACATGTGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGATGGCTGGATAT
3		terminador de pSIM718	UGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGT CTTGGATGATTTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATA ATTAACTGTAAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATAGA GTCCCGCAATTAATACATTTAATACGGGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCA AACTAGGATAAATTAATCGCGCGGGTGTCACTATGTATTAGATCGGG
4		intrón de pSIM374	GTGGTAACCTTTACTCATCTCCCAATTAATTTCTGATTTCATGCATGTT CCCTACATTTCTATTATGAATCGTGTATGGTGTATAAACGTTGTTTCATAT CTCATCTCATCTATCTGATTTTGATTCTCTTGCCTACTGAAATTTGAAGCT ACTGTAACTCGGTGATTAATGTGAATGCTTCCTCTCTCTCTCTCTCTCA GAAATCAATTTCTGTTTGTGTTTGTTCATCTGTAGCTTG
5		35s promotor del virus mosaico de la coliflor ('P2')	TAGCTTCATGGAGTCAGAGATTCAAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCGT AAGAGCTGGGAGAGCTTCATACAGAGCTCTCTACGACTCAATGACAAAGAA GAAATCTTCGTCAACATGGTGGGCGACGACACACTTGTCTACTCCAAA TATCAAGATACAGTCTCAGAGAGCCAAAGGGCAATTTGAGACTTTCAACA AAGGGTAATATCCGGAACCTCTCGGATTCCTTGCCTGAGCTATCTGTCA CTTATTTGTCAAGATAGTGGAAAAGAGGTGCTCTACAAATGCCATCA TTGCGATAAAGGAAAGGCTCATGTTGAAGATGCTCTGCGGACAGTGGTCC CAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAGAGAGAGCTTCC AACCAAGCTCTCAAGCAATGGAATTTGATGTGATATCTCCATGACGTAAAG GGATGACGCAATCCCACTATCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGG AAGTCAATTCATTTGAGAGAACACGGGGGACTC
6		promotor de gen ubiquitina-7 de la papa	TGAGACCAATTGATTGAGTTTATATGCAATATAGTAATAATAAATATAT TCTTATAAGCAAGAGGTCAATTTTTTTTATATATACCAACCTGCTAAT TATATTTGATAAGTAAAGCAATTCGATTTTACTTAATATATCAATGAATAA ACTATTTTATAACCAATTAAGTAATTTTCCATATAGAAAAGTCAATTA AGAGACATAAATAAATTTGAGTAAAGAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT TTTTTTTATCATAAGAAAATTAATTTAATCTTAACCTTAATATAAACCTA ACATATATTCATGGAATCTAATCTTACCTCTTAAGAAATAGAAAAGTGT TCTATATAGACCTCAATTTACATTAATATTTTCAATCAATTTTAAATTA CAATATCAATATGAGGTCATATAACATATCAAAATATATGAAGAAAGAG CAATACATAATATAAGAAAGAGTTTAAGTCCGATATACAGGATGATAT ATATCTTATTTGCTATATATTAACCTCTTATATTAAGGTCATGTTTATG ATAAAGCTGAAATGCGCTATATAGAGCATATATTAATAAATAAATAAC TAAATAAATAATTAAGTTATTTTAGTATATATTTTATATGACCTACAT

		TTTTCTGGGTTTCTCTAAAGGAGCGTGTAAGTGTGCGACCTCATTTCTCCTAA TTTTCCCCACCACATAAAAAATTAAAAAGGAAAGGTAGCTTTTGGCGTGTGT TTTGGTAGACTACACCTCATTTATTAGACGTGTCTCATATAAATTGGTTAAC CCTATGAGGCGGTTTCGTCTAGAGTCGGCCATGCCATCTATAAAATGAAGC TTTCTGCACCTCATTTTTTTCATCTTCTATCTGATTTCATTATAAATTTCT CTCAATTGCCCTTCAAATTTCTCTTAAGGTTAGAAATCTTCTCTATTTTGTG GTTTTTGTCTGTTTAGATTCTCGAATTAGCTAATCAGGTGCTGTTATAGCC CTTA
7	fragmento del gen gus antisentido	CCTTCACCGGTTGCCAGAGGTGCGGATTACCACTTGCAGAAAGTCCGGCTA GTGCTTGTCCAGTTGCAACCACTGTTGATCCGATCAGGCACTTCAAGC CTGACATCACCATTGGCCACCACCTGCCAGTCAACAGACGCGTGGTTACAG TCTTGCAGCATGCGTCACCA
8	iniciador PG	CAAGCGTAAACTCGACCCGACGCGTC
9	iniciador pIE	TTGTTTTTGTTCATCTGTAGCTTCTGC
10	iniciador PIR	TGGAGGAGATGAGTAAAGTTACCACG
11	fragmento 5' del promotor P1 de 300-pb	ATTTAGCAGCATTCCAGATTGGGTTCAATCAACAAGGTACGAGCCATATCA CTTTATTCAAATTGGTATCGCCAAAACCAAGAAAGAACTCCGATCCTCAAA GGTTTGTAGGAAGAATTCTCAGTCCAAAGCCTCAACAAGGTGAGGGTACA CAGTCTCCAAACCATTAGCCAAAAGCTACAGGAGATCAATGAAGAATCTTC AATCAAGTAAGTACTGTTCCAGCAGATGCAATCATGGTCAGTAAGTTTCA GAAAAGACATCCAGCGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCACTCTTTGA
12	promotor del gen GBSS de la papa	GAACCATGCATCTCAATCTTAATACTAATAAATGCAACBAATTTCTAGTGG AGCGACAGTACCAAGTACATTAGATATTATCTTTTATTAGTATAAATAATAT TTTAAATTAACAGAGACATAGGAATGTCAGTGGTAGCGGTAGGAGGGAGT TGCTTCAGTTTTTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTTGCAA GGCCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGGCCCATATAAT TGTCGATGAGCATTCCTATATAATACAGTGTCCAGAGTTGCCCTCCGCTAA GGGATAGCCAGCCGCTATTCTCTTGACAGGTGTCACTGAAACCTGCTACAA ATAAGGGAGGCACCTGCTCATTTCTCACTCACTCACTCAOACAGGCTCAAC AAGTGGTAACCTTTACTCATCTCCCTCAATTTATTTCTGATTTGATGCACTGT TTCCTTACATCTTATTATGAATCGTGTATAGGTGTATAAAGCGTGTGTTGAT ATCTCATCTCATCTATTCTGATTTGATTTCTCTTGCCCTACTGAATTTGACG CTACTGTAATCGGTGATAAATGTGAATGCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CAGAAATCAATTTCTGTTTGTGTTTTGTTTCATCTGTAGCTTGGTAG
13	promotor del gen AGP de la papa	CCGAGTGTGCGAGGGCTGTGCGCAGTGGACATAAATGGCACACGGCTCG GCTCGTGAAAGAGTATGGTCAGTTTCTGTTGTTAGTATTATTCTGCTATTC GGTGTTCATCTCAAGTTAATATGTTCAACACATGTGATATCATACATCCA TTAGTTAAGTATAAATGCCAAGCTTTTACTTGAATCGCCGAATAAATTAC TTACGTCCAAATTTAGTTTGTGTGTCACCAATATCATGCACTATTTGAT TAGAATAAATAAACGATGTGTAATTTGAAAACCAATAGAAAAGAGTAT GACGGGATTGATGTTCTGTGAATCACTGGTAAATTTGACGGACGATGAAA TTTGATCGTCCATTAAAGCATAGCAACATGGGCTCTTAGTCAATCATCATTA TGTTATAATTTATTTCTGAACTTGAATACCAACCTTCAATTGGGAAAGT GACGCAATAGTATAAATTAATAATCAATCTCGCAATTTCCGAATTTATCC AAATCTCTTTTGTGCAATTCATTTCTCTCCCTTATGCTGCAAGTACCAATTA TTTAAGTACAAAATCTTGATTAAACAAATTTATTTCTCACTAATAATCA

[illegible]

21	promotor P1 no-funcional sin la caja TATA de pSIM788	ATTTAGCAGCATTCAGATTGGGTTCAATCAACAGGTACGAGCCATATCA CTTTATTCAAATTTGGTATCGCCAAAACCAAGAGGAAGTCCCATCCTCAAA GGTTTGTAGGCAAGAATTCTCAGTCCAAAGGCTCAACAGGTACGGGTACA GAGTCTCCAAACCATTAGCCAAAAGCTACAGGAGATCAATGAGGAATCTTC AATCAAGTAAGTACTACTGTTCCAGCACATGCATCATGGTCAGTAAGTTTCA GAAAAGACATCCACCGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCATCTTTGAAAGTAA TCTTGTACACATCGAGCAGCTGGCTTGTGGGACCAAGACAAAAGCAATG GTGCGAATTTGTAGCGCAGCTACCAAAAGCATCTTTGCCCTTATTTGCAA AGATAAAGCAGATTCTCTAGTACAAAGTGGGGAACAAAATAACGTGGAAAA GAGCTGTCTGACAGCCCACTCACTAATGCGTATGAGGAACGAGTACGA CCACAAAAG
22	promotor del gen R1 de la papa	TTCAAAATTCATTTGTGTCATATAAAATGAGACATATAATTTGTGGGACAT GCTCATGTATCCAAACAAAGATAATTTGATCATCTATTTCTTTATTTTGA AAATTCAGATAATAATACTTTAAATCACAATAATTAACAGTTHAAATAT TAAAGTCATATAAAAAATTAATTTGACTCTCAAAATTOGTAAAGTACTATA AATTAATAATAATAACAATTAAGAAATTCAGAGTCATAAAAATTTGGTG GCTCTCAAAATATATCAATGTCAATAAAAGTAACATATATTAATTCAGA AATTAAGTAAAGATACCAAAATTAATAATTAACAACTTGAATATTTT AAATTAATAAAAAATTAATTTTAAATTTAGAAATTCAGGGCTGCCACATAAAT TGGGACACGAAATAATATATACATATTTTAAATTAATGTAAAAAATA ATCTAAATCATGATAATTAATACTTAAATATATTAATAAATCATATAAA AAATTAATAATTTGCTCAGGTTTCAGCCGATTTACATAAATTAGGATAA AAATTAATAATTTGGGCCCCGTGCTGGCAGGGGGGCTGATCTAGTTTA ATATAAATTAATCGTTTCTAGTCTATCTCTCTGATGCTAAATAAGTCTG TGATTAATCTTTTAAATTTTCTACTCAGCATGGGGTCCGATCTAGTTTA TATAATAAATATCGTTTCTAGTCTATCTCTCTGATGCTAAATAAGTCTG TGATTAATTTTAAATTTTCTACTAGGTAATGTAATAATCTTATGTAAAC CAATTAATTOAGCAAAATTAATTCAGTTAACCGAGTTAGAGTAAAGTA CTATTGCAAGAAAAATATCAAGAGGCAAAAGAAAGATCATGAAAGAAAAAT CAAGAAAAAGAAAGGTTTCAATCAAACTCCATTAATACTCAAAAAATAA AATTCAAATTCGCAAAACATCCAAATCAAAATGCTCTACTTCAGGGGCC ACGC
23	fragmento de 342-pb del promotor del gen R1	AAAATTCCTATGTTAAACCAATTAATTCAGACAAATTAATTCAGTTAAACCA GAGTTAAGAGTAAAGTACTATTTGCAAGAAAAATATCAAGGCAAAAGAAAG ATCATCAAGAAAAATTAAGAAAGAAAGAGGTTTCAATAAATAAGTCCCA TAAAACTCCAAAAATAAACATTCAAATTCGCAAAACATCCAAATCAAAATTC TCTACTTCAGGGGGCCACGCGGGCTGCATCTCAAACTTTCCACGTTGACA TCCCTAACAAATCACCAAGCTAACCCCTTCTCAAAAGTCCGACACCTCAGTCT TTTTTCTCTATATTACAAATAAAAAATATACGTGTCC
24	fragmento de 151-pb del promotor del gen R1	CATTCAAAATTCGCAAAACATCCAAATCAAAATTCGCTCTACTTCAGGGGGCCCA CGCGGGCTGCATCTCAAACTTTCCACGTCGACATCCCATAAACAAATCACCA CCGTAACCCCTTCTCAAAAGTCGACACCTCACTCTTTTCTCTATATATAC
25	promotor del gen PPO expresado en el tubérculo de la papa	TAATATACATACCATGGGTGGAGCTAGAAGTCTGATTACAAATTTGCTCA AATTCACCAATATTTGCTTAAATAATATATTTGTATAGTAATTTTTTTAC AAAATATATACAAATTTAGGTCAAGGATTCAGTTATTAACCTTTAAATC GTGTCATATAAATTCATGTAAATTTCTGACTTTCCCGCTGCTTACATTA CTTATCAAAATTTATGTTTCTGTGTAGAAAAGTAOTAGTACTACTCTTTGAC TGGTGTAGACGTCTACTATAGATCTCTTATAGATTAAAGTCCAGTTTAA TATTTTCTCTACAAATTAATTTCTTAATCTACCACTACCCGAGTCAAAA TATATTAATGAAATATTTCTATCTAATTAATTTATGATCTACCTATTGATA ATTTGTAACTACTCAAAATGATGGCAAAATAATTAATTAATCTAGACTGA AGTTCTTAGTCAATACCGTAAATGAAGAAAAAAGGCTCAGAGACA AACATGATATCTTTCTTGTCTCTGATTCGTAAGAAAAAATAGTAACTT CATAAAAATCTTATCTCTTGGACAGAGCGATGAAAAAATATATTACTAG TAATACTGAGATTAGTTACCTGAGACATTTCTCTATCTCTCTTTGATTT GATTATTAAGAAAAATTAATTTTCAACGGCCATGCTTATCCATGCAATTA TAATGATCAATATATTAATAATGCTAATTAATTAATGATAGGTTGCTTATTTGCT TGTAACTGAAATATGATGATTAATTAATTAATTAATTAATTTCTCTAATA AATCTATCAACAGAGGCTTAAGAGATTAACAAACTACTATTTATGACAG TAGTTATTTTCTGTTTACTACAGATCTTCCAGAACAAAACTTAATA ATTTGATAGGCTGCTATACATAATTTCCCACTACCGCTTCTGGAATTAAT GATATGGAAGCCGCTCTAAATTTGAATAATTAATTAATTTTACATATTAAT ATAA

26	fragmento de 200-pb del promotor del gen PPO	AAGTTATTTTCTGTTTACTACAGATCCTTCCAAGACAAAACTTAATAA TTGTATGGCTGCTATACATAATTTCCCGACCTACCGCTTCCCTGGAATAATTG ATATGGAAGCGGCTCTAAATTTGAAATTAATTAATCTGTTTACATATATA TAAAGCAAGGTATAGCCCAATGAATTTTCATTCAAAGCTAGCAATA
27	fragmento de 460-pb del promotor del gen PPO	CTAGTAATACTGAGATTAGTTACCTGAGACTATTTCCCTATCTTCTGTTTG ATTTGATTTATTAAGGAAATTTATGTTTCAACGGCCATGCTTATCCATGCA TTATTAATGATCAATATATACTAAATGCTATTACTATAGGTGCTTATAT GTTCTGTAATACTGAATATGATGTATAACTAATACATACATTAATTTCTCT AATAAATCTATCAACAGAGCCCTAAGAGATTAAACAAATACTACTATTTATCC AGACTAAGTTATTTTCTGTTTACTACAGATCCTTCCAAGAACAAAACTT AATAATTTGATGGCTGCTATACATAATTTCCCGACCTACCGCTTCCCTGGAA AATTGATAGGAGCGGCTCTAAATTTGAAATTAATTAATTAATCTGTTTACATA TTATATAAAGCAAGGTATAGCCCAATGAATTTTCATTCAAAGCTAGCAAT A
28	promotor del gen Fad2 de Brassica	ATTGAGCTTGAAGGAACATTCGAGCAGATAAAGGAAGCGAGCGCATGGTT AGAGAGCTGATTTGGGAGGCTTAATTTCCGATCTAGGAGACCACTTGGTGGC GGTGGTGGCGGGGCTGGGCTTGGTTCTGAAGGGAACCCATCTCCAGGAAGC AAGTTCAAGCAGAAAGATGTGTGAGAGATTCTCTAAAGGAAGCTGTACATTT GGTGATAGATGCTACTTTGGCTCAGCGGGAAGCAGAGCTACCGAGGTCATGA ATTGCGCTAGAGTTACTGCTGAAACAAAGTCTCTTTCATTCTGTTGTTGA TTCTTAATATCACTTCTCTGCTACTGTTTGTAGTTGCTCTGTTTTTTGAA ACTACAAATGTTAGTTTTCATTGTGAGTGAAGTTTTCGCCATTGTTGTT TTTTTAGAATCTAGTTTGAATTTGAGATGGGGCAAGCTTGATGAATGATG GCAGAACAGTGGTTAGGATTTGTGTGCTGCTCTACTTAATAATTTGATGTT TTATCTACTTTATTTTGGTCAGCAAGTTGATGTGTTCTCTGATGGTGTG TGATTATCAGCTTAGATTATTTTGTGAGTATGCTAGACTGTATAACTAATC GTTGTGATGTATAGTTCTCTTATAATGTTTGATAGACTATATACTAATAA AATTCATGPTATTAATAGCGCTGCTGATAGTAACAGCTGAATTAATGA TGAAATCATGGTATGCTGATGATCTTTAAAGAAATGTTAAAAATAATGTCG TTATAAGCGGTAAATGCATAGAAAAOCTTAATCATCTTAACATAAGAGAGA GCGATAGCTTTAATAAAGTACTTAAATTAATTAATAGTCCGCGCTGCTG CTACTTGTGACCACTAATTAATTTATTATATATATGACGAATCTCCA AAGTACATCACACACTCGGGGCTATTACGCTGATCTCAACCCAAATGTC TGCAGATATTTTTTAAAGTTTCTCTCAATGGGAGAGAAAGAGCGCAAG
		CACG
29	fragmento de 441-pb del promotor Fad2	CCGGCTACCACTAAGTTCTACAGTTCTACTTGTGAGTGGCAAGGACGTTT CCTCATATTAAGTAAGACATCAAATACGATAATCTTAATGCTAATTAAC GTAACGGATGAGTTCTATAACATAACCCAACTAGTCTTTGTGAACATTAG GATTGGGTAAACCAATATTTACATTTTAAAAACAAATACAAAAAGAAACG TGATAAATTTATAAAGCAATTTATATGATCAGCGCATCTTTTCACTTTT CGGTAAATATATATTAAGTGGTGTAAATATCAGATATTTGGAGTAGAAAAA AAAAAAGAAAAAGAAATATGAAGAGAGAAATATGAGGGGGCCCACTT GTAAAAAAGAAAGAAAGAGATGTCACTCAATCGTCTCACAGGGGCCCGG TCAATTTAAACGGCTGCCCTTCTGCCGAATCGC

5	30	promotor específico a la semilla del gen nabo	AAGCTTCTTCATCGGTCATTGATTCTTTAAAGACTTATGTTCTTATCT TGCTTCTGAGGCAAGTATTCAGTTACCACTTATATOTGGACTTCTGACT GCATCCGATTTTCCAACTTTTAAATTTCACTATTTGGCTGAATGCTTCT TCTTTGAGGAGAGAAATTCAGATGGCAGAAATGTATCAACCAATGCATA TATACAAATGTACCTCTTGTCTCAAAACATCTATCGGATGGTCCATTG CTTTGTCATCCAATAGTGAATCTTTATATTTTCACTCTCTTATATAC TATTTTCAATGCCAGGTTGCCATCTACATTTATTTTGTAAAGGATTCACGCTA TTGAGCGTTTCTTCAATTTCTTTATTTTAGACATGGGTATGAAATGGT TGTATGAGTTGGGTTGAATGAGATTTACGTTCAAGTGAATGGCATACCGTT GTCGATTAAGGATGACCTACCCATTCTTGAGACAAATGTTACATTTTAGTA TCAGAGTAAATGTGTACCTATAACTCAATTCGATTCACATGTTATCCATT CAACATTAATTAACCAAGCCTGCACCTGCTGCATCCACATTTCAAGTATTTT AAACCGTTCCGCTCTTATCCACCGGGTGTACAAAGACGGATTCGAAATTTG GAGATTTTGAATCAATTTCCCAATTTATATTTGACCGTGAATTAATCAACT TTAACTTCTATAATTTCTGATTAAGCTCCCAATTTATATTTCCCAACGGGACT ACGTCCTAAATTTATAGACTCTCATCCCTTTTAAACCACTTAGTAAAGG TTTTTTTTTTTAAATTTTATGAGTTAAAGTTTACCTTGTTTTAAAGA ATCGTTCATAGATGCCATGCCAGAACATTAAGCTACACGTTACACATAGCA TGCAGCGCGGAGAAATTTGTTTTGTTCCGCACTGTCACTGCTTCAACA CCTAAGAGCTTCTCTCTCACAGCACACATACAAATCACATGGGTGCAATGC ATTA
20	31	promotor específico a la semilla de Brassica napus	CTGCGAGTACAAAGAGGAGCTCTACTTAGTTATGACTTATGCGGAGTGG AAGCCTTGACAGAGTACCTCTACACCGAATCAGATCAAGAAATATATGAAAGT CACAGAAATCTTAGTATTTGTTTACTCTATCTTTCTATGTAATGCTGT TTTTGCTTTTCAAAAGAGCTTTGAGAAATTAAGAGAGATAACTTGTG TTAAGCTATTTTGGTTGGGTTTTCGGGAGAACTTTTGAATAATGACCA ACTAGGTGTTTTGCCCTCGATGCGGATTAACATTTTCATATTTTGA AAGTCTTTGTACACTATATTTATTTATATACTAAATTAATCTTAAATTAAT TAATATTAATTTTAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT TTAATTAATTAATTTATGTTTAACTTTTACATAATTTTTCAGATAA CAATACAAATATATATATAGAAATATCTTTTAAATTAATTAATTTTAT GATCTGGATAATTTAATATTAATTTTATATATAATTAAGAAATTTAT TTGATTAATTAATTTAGTTATTAATTTATGTTTAACTTTTATATATTAAT TCATGTTTTTAACTTTTAACTAAATTAATTTTTCAGATAAATTAATTAAT ATACATAAATTAATCTCTTTTAAATTAATTTTTCAGATTTTGGATAATGC
35			TTACTATTATTAATTTTAAATCAATTTATCTAATCAATTAATTAATTAATTTT TTTTATAGGATATAAAGCATATTAATCATTTCTAATTTTAAAGTGAAGAGT CGATTCGAAATTTACTTCCGCAATAATAGTATATATCTAGCTTATAGG GCTTTAAAGGTTTAGGTTTCTTACGCTTTAAATGTTTTTTTAACTATA ATTTGAACGTTGTTAAACATACTAATCAAGTGTAAACCTTGCTTTATTT ATTTTCCAACTTTTAGATTAAAGCATAAGGTTGTTACCATAAAGAGAGA TTAAAGCATAAAGAGATATCATTTGGTATATATTTATGCCAACGTATAT TTGTTTTATCTTTTATGCAACGCATACATGTGGACTTGAAAGAAACG ACAAAGAGGAGCTTAACACAACTCCCAATGTCACTTAAGCTATAGT TCGTGACGGTCTCTCAATGGAATCGTGGTGTATCAATGAAAGAAACGT TGTGCTGAAACTGGCAGAGCACAACATATAGTCTAAAGAGGATTGAATGA AGCAAAATGCAAGAACCAAGGCACACGATTTCTCACTTTGAATGATA TTAGAAATATTAAGTTTCAATTTGCCAAGTGGACATCCACGTGGTAGAGGA GCCATGCCACTTGTCTCTTTCTGGGTTCTCAGCCCGAGTTACATTTGAA AATTACAAATTAAGAGACATTTGTATATGATTTGACATTTTACCTTGG CATATACATGTTTGAATCTAATTTCACTAATCCATCTCTTATCATTT TTAGTTAAGTAAAGCATCAATGTTAACCATGATTTCTAATTTGAATTA TTCAATGATTTGATATTTATATTTTATTTTATATTTTGGTTAAAGAC AGACTCTTATATCTTTTATTTAAGAGATAGTTCTTAATTTTCTTAATTA AGTTAAGAAACGGTCTTAAACCAATGTAAAGACATATTTGAAGGCTCG GATTTATTAATGATCTAAGGACTCACGATCAATTTACCTAATCAATCTA AAATATAGTAATTAAGCTTTACCGCATGTGATCTGCCAAATAATTA ATAATATTAAGACACAAGAGGATGTGATAGTGAGGAATCTGGAGGCAAT TTAGAACTGATGCTGATTAAGAGAGAAATATCTTCAAAATTTAAT TACAGGATAGATGACGTCATTTTCCATTTGTTTTGTTAATTAATTAATTA TTTCTCTCTCTCTTTCTCTCGAGGTGATGACTCTTCCCTCAAACCGCTGT TTCTCATTAACCATATTTCTTTCTGTGGAGCAACTCAACCTTAAGAGAC AGAGAGAGCATTAGCCTAGAGAGAGCTCGCTCTGTCTGAAAGAACATCAA

5	32	promotor del gen Fad12 de soja	CAGAAAAAGGGAATAGATTGGATAAAATAGATTTTAGGCTCTCAATTCCGT AGTCAAAATTAGTCTCAATCATTATGCTTAAAAATGATGATTTTGACACT TGGGAGATTAACATATTTCTTAAAGTTTGATTCTCAAGTTNGTATATATGA AATAGTGTGTTGGGAGAACTAAACTCTTAAAAATAAATTTTATATTTTGA GATGATTTCTCTCATTCTTATGAAGGAGATATACAGAAAAAATGATTTT TATTTTTTATTTTTTATTTATGAACTTAAGAAATTAAGATACCAGGATGAG GGACAAAAGTCATTAAATATTAATAAATAAATAAAGAAATCAAGATTATAT TTTTAAAAATATAAAAAAACTAATTTTGATATATAAAGAAATCCAGGGGAT ATAATACACACTCTATCCCAATATTGGTTAAACCCCGAGGGGCCAATG TTTCGTCTTTCTCAACAGTATAAATGCTAATGATATATTGTCCTTGA TTGCTTCTGTGGCTAGCATATCTCTGCAACTTGTGCAACCATTTGGTAA TCAATTAAGAAATATATAATATACCTTAAATTTACTAGGATGCATAAAAAAC CCTGTGACTTGTCTGACCAAGACTTGCCAAATTTTTTATCATGCATTACA AAAAACGACCATTTGTTTTATTTTTTGGATTTCTATTTCTTCCAAATGAA GGCTAACAGATAAATTCATGCTAATTTCCCTTGTATTAGAGAAATA AGAAATATAGCTTTTGGCTTGGCTTTTGAACATATTTTACACTCTTTGC AGGTTGCTTTTTATCTTGGAGACCAAGGAGTCAAAATAACAGTGTGCGG GTAAAGTAAGTGGCTGACATCTGGAATAGTCTCTTATGCGTATGTGCGCA TCATTTTGAAGCTTGTNGGCTTGCAATCACCATTGAAGAAATTAAGTTGA TGGTTAAATGGTATAGCTTTTGTCTTCAATATTACTCGAATTACATTAG AAAG
25	33	promotor del gen Comt de alfalfa	AAATGAAGAGAGGTTAAGGATTGAAATGAAACTGGTAAAAACAGCTTATT TTAAAAACATCTATTGAAAACAACTTATTTTATTTAAAACAATTTATTTTA TTCAAAACATGTTTTGAATAAGTTGTTTTTGAATAAAGCTGTTTTGAAT AAGCTGTTTTTAAATAAAGGTGTTTTTCAATAAATAAGTTGTTTTTGTAA AATAAGTTGTTTTTCAATAAGCTGTTTTTGAATAAGCTGTTTTTTTTTAA ATAAGTTGTTTTGAATAAGCTGTTTTTGAATAAGTTGTTTTTTTAAAT AAGCTGTTTTGAATAAGTTGTTTTTGAATAAGGTTTGCATAAATAAG CTGTTTTGAATAAGTTGTTTTGAATAAGTTGTTTTGAATAAGCTGTTTTT TTAAAAATAAATGTTTTTCAATAAATAAGCTGTTTTTGAATAAGGTTGTTT TGATAAATAAGCTTTTTTAAATAAGCTATTCAATAAGTTGTTTTTTTGG AAAGATCCACAAAGAGTTCAAGTGGTTTCTTTAAATAAATAAATAAGTT CAAGTGGTTTGGTTTCAACCGGTTGCTTTGGGTTCAAGATGGTTGCG TTATGGTTCAAGAACTGTTAATAAATAACGGTTGCTTGGTTGTTGAACCTTA TAACGATTCGGTTATTTTTGCTTCGGTTGCTTCGGCTGCTTCGGTTGCTTCGGT TCATGGTTCTTTTTGCCACCCCTAAGAAATAAATAAGTTGGTTGGT TATCTTAAAAATGATTTGTTTTTGAATAAAGAGTTAATAAGGGGCTCA AAGAGCAACCATCTAAGGTAAGCTCTACATTTAGAGTTGATGCGGTTAAA ATTTGGATATAACACTTTTGTGACCAAAATGCTCTTATGAATAAGACTG AAAAGAGTAATAATTTAAAAAATAAATAAATCCGGCTGTTGCATTTTTTAA CAATAATCCGAAGAAAGATGTTTGAATAATGTTTATAATGAGAAGTTATT TTGAGTTTTTTTCTCTTCAATAAATAAATAAGTTATTTTCAATATGTTTAC ACCATAAAACTACTCTGTTTTTTTAAAGAACTCTCAAAATCAATTTCT AAACGTCAAAAGTTTTTATACAAATAGTTTACGGTGTCTTATGAGGGTT TGATAAATATTCTACGACTATATATATTTTTTTTTTAAAGGAAATCTACGA CTACTTGTAGTTGGAATATGGAATACGACTACTTTCTATGAAGAGCAGG TTACGGTAGACACAAAAGCTGACTCTTGGCAAGGCTGTTCAACCCATA GTACATATTAGGAAATGAAAAATACCTAATGCGCTCCTTTCAATACTCA AGAAAGTGCTCCTTACCAATATTGCTTCTTTTAAAGAGCAGAGAGA ACACATTTGTTACAGCAACATGATTTTTGTATGCTTGTAAATGAAGAGCT TCTAGTTATCCAGCTCAACCGGCTAAGGTTCTATTCAATTTGCTTAGAA ATGAGGCATCAATATATGATGCAAAATTTTGTACTCAATCTCAATTCAAA ACTATATGAATTTGTTGTTGCTCAGCTAAGTAAATACACTATCTAAATTTGA GTACAGTACTTCTCTGTCAGGGGAGAAAAACACTCAAAATCAATTTGTTA GAGTAATATTTGTATCATAAATTAATTAATTTTACAAATACATCAATAA TGTCATTTGTTAATCAATAATATATGACAAAATTTCTTTGAAATATACT GAGCAAAACAAAATCTATTAATGCTGCAACGGCAACACATTTCTGTTTA CAATTAATTTGCTGACTACTCAGTCAGTATAACCAATTAACCATATAGC ACGAATTCCTTAGTGGGTTCCACATTTGTTGGTGGTGGTGGGACCCAAATG TAATGGATGGCCCATACACCAAACTCAACCAACCAATTTCTCATAAAGT TCTATATAATAGCAATCCACTTTGCTCATTTGAGG

[illegible]

		CAAAACAGAAAGGAGCAAAACATTCCAAAGATTTAACA
38	fragmento de 171-pb del promotor Ccomt	CATCAATAGTGGACTGGCCACACTCATTGCTTTGCTTTAGTATAAGAAAAG TGAACCTCACCAAGCACAAGCCGAGCGCAACCGGTTCAACCAAGATTAC AGCAATTTTCCCTTAACCATACCGGTTTTCCCTCCCTTATATAAACCATCTT CCTACCTCTTATCTAACC
39	promotor del gen de la poligalacturona de tomate	AAGCTCTTTAAAAAGCCAATTGATTAATTTGAAGTCAAAATAATTAATTA TAACAATGGTAAAGCACTTAAAGAAACCATAGTTTGAAGGTTACCAATGC GCTATATATTTAATCAACCTTGATAATATAAAAAAATTTCAATTCGAAAGG CCCTAAAAATATTTCTCAAGTATTCGAAATGGTACAAAACCTACCATCCGTC ACCTATTGACTCCAAAATAAAATPATTATCCACCTTTGAGTTTAAAAATTTGA CTACTTATATAACAAATTCANATTTAAAGTATTTTAACTCTTTAAAAATA CATGGCGTTCAAAATATTTAATATAATTTAAHTTATGAATATCATTTATATAA CCAGCAACTACCAACTCATTAATCATTAATCCCACCCCAATTTCTACTAT CAAAATTTGCTCAACACTACTAAACCAAGACGAAATTTGTTCCGAGTCCGAA TCGAAGCAACCAATCTAATTTAGGTTGAGCCGCATATTTAGGAGGACACTTT CATAGTATTTTTTTCAGCATGAATTTGAAATTTAAGATTAATGGTAAAG AAGTAGTACCCCGAATTAATTCATGCGCTTTTTTAAATATAATTATATATAA TATTTATGATTTGTTTTAAATATTAAACCTTGAATATATTTATTTTAAAAA AATATCTATTAAGTACCATCATATAATTGAGACGAGGAATAATTAAGATG ACATAGTCTTTAATTAAGTAAATGGATGGGTAGTAAATTTATTTATATTA TATCAATAAGTTAAATTTTAAACAAATATTTGAGCGCATGTATTTTAAAAA ATATTAATAAGTTTGAATTTAAAAACCGTTAGATAAATGGTCAATTTTGAA CCCAAAAGTGGATGAGAGGGGTATTTTGAAGCCAAATAGGGGGATGAGAGG ATATTTTGAAGCCAAATATGTCATGGATGGAGGATAATTTGTATCATCTTTCT AATACTTTAAAGATATTTTAGGTCATTTTCCCTTCTTTAGTTTATAGACTA TAGT
40	ADN de transferencia de pSIM870 (Russet Boise III)	TGGCAGGATATATACCGGTGTAACGAAAGTGTGTGTGTTGATCCAAAATC TATCGTACCTTTAGAAAGTGTAGCTATGAAGGAATAGTCTCACTTATGAAGA ACTACCTATTGAGATTCTTGATCGTCAGGTCGCAAGGTTGAGAAAAATAGA AGTCCGTTCACTAGGGCTTTGTGAGGAGTAAGCGTACCGAACCATGCAT CTCAATCTTAATACTAAAAAATGCAACAAATTTCTAGTGGAGGGACCGATA CCAGTACATTAGATATTTATCTTTTATTACTATATAATATATTTTAATTAACA CGAGACATAGGAATGTCAAGTGGTACCGGTAGGAGGAGTTGGTTCACTTT TTTAGATACTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCATTTGCAAGGCCAAAGTTG AAGTCCAGCGGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATTAATACTGTCTCATGAGC AFTTCCCTATAATACAGTGTCCACAGTTTGCCTTCCGCTAAGGGATAGCCAC CCGCTATTCTCTTGACAGTGTCTCACTGAACCTGCTACAAATAGGGCAGGC ACCTCGCTCATCTCTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT TTTACTCATCTCTCCCAATTAATTTCTGATTTGATGCATGTTTCCCTACATT CTATTATGAATCGGTATTTGTTGATATAAACGTTGTTTCATATCTCATCTCA TCTATTCTGATTTTGTATCTCTTGCCTACTGAATTTGAGCCCTACTGTATC GGTGATTAATGTGAATGCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT TTCTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTG ACCAACATCTACCGATCCGCCAAACATAATTTGTAATCTGATTTTATCTCTGAA TAACCACTTCAATGAATCAAGCAACAAAGCTGATTTCAACATGAAAAAAG AGAACAAGAAAAACGAAAACAGAGCATCATCCATCAAGATGATATCTCAGCA
		GATT
41	fragmento del remolque del gen fosforilasa	GAGGGGGAGTGAATGAAAAATAACAAAGGCACAGTAACTAGTCTTCTCTTT TTATCATGTGATGAAGTATATAATGTATGTATAGAGGATGATGTTATTA CCACATAATAAGAGATGAAGACTCTGATTTTCTGCTT

42	ADN de transferencia de pSIM870 (Russet Boise IV)	TGGCAGGATATATACCGGTCTAAACGAAGTGTGTGTGGTTGATCCAAAATC TATCGTACCTTTAGAAAAGTGTAGCTATGAAGGATAGTCTCAOTTAATGAAGA ACTACCTATTGAGATTCTTGATCGTCAGGTCCGAAGGTTGAGAAAAATAGA AGTCGCTTCAGTTACGGCTTTGTGGAGGAGTAAGGGTACCGAACCATGCAAT CTCAATCTTAATACTAAAAAATGCACAAAAATTCATGTGGAGGGACCAAGTA CCAGTACATTAGATATATGTTTTATTACTATAATAATATTTAATTAACA CGAGACATAGGGAATGTCAAGTGGTAGCGGTAGGAGGGAGTTGGTTCAAGTTT TTTAGATACCTAGGAGACAGAACCGGAGGGGCCCATTTGCAGGCCCAAGTTG AAGTCCAGCCGTGAATCAACAAAGAGAGGGCCCATTAATACTGTCCATGAGC ATTTCCCTATAATACAGTGTCCACAGTTGCCCTTCCGCTAAGGGATAGCCAC CCGCTATTCTCTTGACACGTGTCACTGAAACCTGCTACAAATAAGGAGGC ACCTCCTCATTCTCAGACTCAGTCACTCAGACAGCTCAGCAAGTGGTAAC TTTACTCATCTCCTCCAAATTAATTTCTGATTTCAATGATGTTTCCCTACAT CTATTATGAATCGTGTATGAGGTATAAAGCTTGTTCATATCTCATCTCA TCTATTCTGATTTTGAATCTCTTGCCCTAGTGAATTTGACCCCTACGTGAATC GGTGATAAATGTGAATGCTTCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCAGAAATCAAT TTCCTGTTTTGTTTTGTTTCATCTGTAGCTTGGTAGATTCCCTTTTTTGTAG ACCAACATCAGCGGATCCGCCAAACATAATGTGAAGTGAATTAATCTTTGAA TAACAACCTCAATGAATCAAGCAACAAAGCTGATTTCAACATGAATAAAC AGAACAAAGAAAACGAAACAGAGGATCAATCCATCAAGGTGTAATCTCAGCA GATTCAAATAGAGACTAATCTGAGGTGCTCTCTATGCAAAATCTAGCTTTTCG AATGAGAGTGAATAAGAGAGTGAAGATTGTGAATTAATTTATGATGAAGAT TGGAGAGTCAATTAATGATTCACACAGAGGAATTAAGTGTGTGTGTGTG GTCTCTCTGTGGAAATTAATGTCAAGCTTTTTTTTATTTATCAATAAAGC ACGAAATCTCCTGCACACTCCCTGCACTCTCTTATATTTGTCCATTTTC CCACAAATCCCTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT TGAAGACTCTTCATCTCTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT ACATTATATACCTTCATCAGATGAATAAAGAGAACTACTTACTGTGCT TTGTTATTTTTCATTCACTTCCCCCTCCCGCGGGTTAAATTCATGATTTTA TGAAGTCAATAGCTTTTCATTAATGAGCAATATTAATCTTTCTTCAAGTGA ATCCACATGCTCTTATGCTCGCTGAAATAGTTTGGCCGTGGAGTTTCACC ATCTATCTTTACAAATGATTTCTGTAGCTGCAGGAGGGGGAAGTGAATGAA AAATAACAAAGGCACAGTAAGTAGTTTCTCTTTTATCATGTGATGAAGGT ATATAATGTATGTGTAAGAGGATGATGTTATTAACACATAATAGAGATGA AGAGTCTCATTTTCTGCTTAAGCTTGAAGTGTGGGTAACTAATTAAGTTAGG GATTTGTGGAAATCCACAAATATAAGAGAGTGCAGGGGAGTAGTGCAGGA GATTTTCGTGCTTTTATTAATAAATAAAGGGTGCATTTAATTTCCA
----	---	--

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

GAAGAGGACGCAACAGAACACACTTAATTCTGTGTGTGAATCAATATATG
ACTTCTCCAACTCTCATCAATAAAATAATTCACAACTCCTCACTCTCTTATC
ACTCTCAATTCGAAAAGCTAGATTGGCATAGAGAGCACCTCGAGTTAGTCTC
TATTGAATCTGCTGAGATTACACTTTGATGGATGATGCTCTGTTTCTGTTT
TCTTGTCTGTCTTTTTCATGTTGAATCAGCTTTGTTGCTTGATTTTCAATTG
AAGTTGTTTATTCAAGAAATAAATCAGTTACAATTATGTTTGGGTCTAGAGTG
ATGTGTGGTCTACAAAAGGGGAATCTACCAAGCTACAGATGACAAAAAC
AAAACAGAAATTGATTCTGAGAAAGAAAGAAAGAAAGAGGAAAGCATTACAA
TTTATACCGGATTACAGTAGGGTCAAAATTCAGTAGGCAAGAGAAATCAAAAT
CAGAAATAGATGAGATGGGATATGAACAACGTTATACACCATAAOACGAT
TCATAATAGAAATGTAGGGAACATGCATGAATCAGAAATAATTGGAGGAG
ATGAGTAAAGTTAGCACTTGTGTAGGTGTGTGAGTGAATGAGTGTGAGAA
TGAGGAGGTGCTGCTTATTTGTAGCAGGTTTCACTGACACGTTGTCAAGA
GAATAGCGGTGGCTATCCCTTAGCGGAAGGCAACTGTGACACTGTATTATA
TAGGGAATAGCTCATCGACAGTATTATGGGCCCTCTCTTGTGTGATTACAG
GCTGCACTTCAACTTGGGCTTGCATTTGGGCCCTCCGTTCTGTCTCTCTA
GTATCTAAAAAAGTGAAGCAACTCCCTCCTACCGCTACCACTTGACATTCT
TATGCTCTGCTGTTAATTAAAAATATTATTATAGTAATAAAGATAAATATCTA
ATGTAGTGGTAOTGGTCCCTCCACTAGAAATTTGTGTGATTTTGTAGTAT
AAGATTGAGATGCTATGTTCCAGGTCCCGCAGTGTGCGAGGGCTGTGCGCA
ATGGACATAAATGGCACACCGCTCGGCTGTGTGAAGAGATATGGTCAGTT
TCATTGATAAGTATTTAOTCGTATTCCGTGTTTACATCAAGTTAATATGTT
CAAAOCACATGTGATATCATACATCCATTAGTTAAGTATAAATGGCAACTTT
TTACTTGAATCGCCGAATAAATTTACTTACGTCCATATTTAGTTTGTGT
GTCAAACTATCATGCCACTATTGATTAGGATAAATAAAGGATGTGTAAAT
TTGAAAGCCAAATAGAAAAGAGATATGACGGGATTTGATGTTCTGTGAAATC
ACTGGTAAATTTGAGCGGACGATGAAATTTGATCTCCATTTAAGCATAGCA
ACATGGGTCTTTAGTCATCATCATTATGTTATAATTTATTTCTTGAACCT
GATACACCAACTTTCATTTGGGAAAGTACAGCATAGTATATAAAGTATAATAT
CAATTCCTGGCAATTTGAAATTAATCCAAATCTCTTTGTCATTTCTATTCC
TCCCTTATGTTCTGGAAGTACCAATTAATTAAGTACAAAAAATCTTGATTAA
ACAAATTTATTTCTGACTAATAATCAATTTAATCATCAACGGTTTCATACA
CGTCGTGACCTCTTTTATTCTCTCAAGCGCATGTGATCATACCAATTA
TTTAATAACAAAAATCTTGATTAAACAAATTCAGTTTCTCACTAATAATCA
CATTTAATCATCAACGGTTTCATACATCCGTCACTCTTTTATTATCTCT
CAAGCGCATGTGATCATACCAATTAATTAATAACAAAAATCTTGATTAA
CAATTCATTTTCTCACTAATAATCAATTTAATCATCAAGGGTTTATACAC
GTCCGCCACTCTTTTATTCTCTCAAGCGTATGTGATCATATCTAAGCTC
TCGTGCAAAACAGTGAAGACGTTCACTAATAAATAATCTTTGAAATAC
TTGTTCAGTTTAATTTATTTAATTTGATAAGAAATTTTTTATTTATTTGAT
TTTTATTGTTTAAATTAABATAGTTAAATATATCAAAATATCTTTTAAAT
TTTTATTTTGAATAATAGCTAGTTCAAAACAAATTAATTTAGTAACTGT
TTTTTCGAAAAATAATGATTCTAATAGTATATTGTTTTCTCATCTAGATA
TTTTTTTAAAGTAACTACAAAGTATATTTCAATCCCCAAAATAGCCTCA
ATCACAAAGAAATGCTTAATCCCCAAAATACCTTCATCACAAAGACGTGT
TACCAATCATACCTATGGTCTCTGCTAAATTTCCGACAAATCAGGTCTAT
AAAGTTACCTTGATATCAGTATTATAAACTAAAAATCTCAGCTGTAAAT
CAAGTGCBAATCACACTTACCACACACTCTCTAGTAGAGAGATCAGTTGAT
AACAAAGCTTTTAAGGGATCCAAATTTCTATGTTAACCAATTAATTTGAG
ACAAATTAATTCAGTTAACCAAGTAAAGAGTAAAGTACTATTGCAGAAA
ATATCAAGGCAAAAGAAAGATGATGAAAGAAAAATCAAGGAAAGAA
GAGGTTACAAATCAAACTCCCATAAACCTCCAAAAATAAACATCAAAATTTG
AAAAACATCCAATCAAAATGCTCTACTTCAGGGGGCCAGCGCGGCTGGAT
CTCAAACTTTCCACGCTGACATCCCAAGCAAAATCACCAAGGTAACCTTC
TCAAAACTCGACACCTCACTCTTTTCTCTATATTAGATAAAAATATAC
GTGTCGCCCGGGTTAAATTCATGATTTTATGAACTCAATAGCTTTTCATA
ATGAGCAATATATCTTTCTTCACTAGCAAAATCCCATGCTCTTATGCTCG

5		CTGAAATAGTTTGGCCGTGGAGTTTCACCATCTATGTTTACAATTGATTC TGTAGCTGCAGGGACACGTATATTTTATTTGTAATATAGAGAAAAGAG TGAGGTGTCGAGTTTGGGAGGGTTACGGTGGTGAATTTGTTATGGGATGT CACGTGGGAAGTTTGAGATGCAGCCGGCGTGGGCCCGGTGAAGTAGAGCA ATTTGATTTGGATGTTTTCGCAATTTGAATGTTTATTTTGGAGTTTATGG GAGTTTGAATGATAACCTCTCTTTTCTTTGATATTTTCTTCTGATCTTT TTCTTTTGCCTTGAATTTTCTTGGCAATAGTACTTACTCTTAACTCTGG TTAACTGAATTAATTTGCTCAATTTTATTTGGTTAACTAAGAAATTTTCT AGAGTGAATGTTGGTCTACAAAAGGGGAACTACCAAGCTACAGATGAA AAAAACAAAACAGAAATGATTTCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCA TTCACATTTATCACCAGTATAGATAGGGTCAAATTCAGTAGGCAAGAGAA CAAAATCAGATAGATGAGATGAGATATGAAACACAGTTTATACACCATAA CACGATTCATAATGAATGTAGGGAAACATGCAATCAAAATCAAAATTAATG GAGGAGATGAGTAAAGTTTACCACTTGTGAGCTGTGTGAGTGAGTGAGTG TGAGAAATGAGGAGGTGCTGCTTATTTGTAGCTGGTTTCAATGACACATG TCAGAGAGATAGCGGGTGGCTATCCCTTAGCGGAGGCAACTGTGGACAT GTATTTAGGGAAATGCTCATCGACAGTATTTGGGGCCCTCTCTTTTGTGA TTCACGGCTGGACTTCAACTTGGGCTTGGCAATGGGGCCCTCGGTTCTGT CTCCTAGTATCTAAAACACTGAACCAACTGCTCTTACCGGTACCACTGA CATTCCTATGCTCTGTGTTAATTAATAATATATATAGTAAATAAGATTA TATCTAATGTACTGTTACTGGTCCCTCCACTAGAAATTTGTGCAATTTT AGTATTAAGATTGAGATGCAATGGTTTCAGGCTCCTTCAACATGTTATAAAT TCACATATTCAGTTGGGAATAGGCTTTATATAGTGGACTACGTTATGT CCCCCTCAAATCCAGAAATATGTGCCCCGTATGTTATAGTCCCCCTG CGGGCATCAATTTAGTGTATCAGCCAGACATGCTCTATACCTCGGCCAGG ATATATTTGTTGGTATAG
10		
15		
20	43 intron R1	GTAAATTTCTAGTGATTATACCTGACATTTGSCATAATTTAGGATCGTATT TGATATGTTTACGCTTGAATGATCGAGAACTTAAAGCTTTTCTGATCTGA AATTTCTTTTGGCATACTGAGTTGAGATCCTGGTTAATCAAGTGTAT TTCGATTGAATTTAGCAAAATTTGGTGTGATTTTCAATATTTTCAATG TTAATGTATATTAACAGCTTAAATTTTCAATTCAGCTCGTTTAACTTT TTAATTCAGCATATTTCTGGAAAAAGTTTGGTGAATTTCTGTAGATGTT TATTCGAGAAAAAACAACAAAAAGGGGAAATGCTGTTCTGTATGT ACAAAAAGTGAATGATCAGCTTTTGGTACCGGACATACATTTGATTAGTAC ATACACGAGTCATAGGAGTATATTTCCGTGTGGACTTTATTTGTTTGAAG AATTCGGATTTGGTGAATTCCTTTTAAAACTTCTAAATTTTGTGTTA CATTTAGTCTAATTAAGTCTCTCTGTGAATGACAAATCTCAGCAGGC ACACATTAACCTTCTTTTGAATATCCGCAACGATCCATGCTTTTGTG TATATGCTTTTGTATGACTGATTTTGTATTTGATTAGGAG
25		
30		
35	44 st02 borde de patata	CATTACCAACAAATATATCCTGGCC
40	45 Le01 borde de tomate	CATTACCAACAAATATATCCTGGCC
45	46 borde de tomate	CTCTACCTCTGAATATATCCTGCGG
50	47 Ca01 borde de pimienta	CATTACCAACAAATATATCCTGGCC
	48 Ma01 borde de alfalfa	GTATACCTCTGTATACATCCTGCGG
	49 Hv01 borde de cebada	ATATACCAAATGATACATCCTGCCC
	50 Os01 borde de arroz	ACTTACTCAAGGTATATCCTGCCT

51	fragmento central de 300-pb del promotor P1	GGCTCAACAAGGTCAGGGTACAGAGCTCTCCAAACGATTAGCCAAAAGCTAC AGGAGATCAATGAGAGATCTTCATTCAAGGTAAACTACTGTTCAGAGCAT GCATCATGCTCAGTAAGTTTCAGAAAAGACATCCACCGAAGACTTAAAGT TAGTGGGCACTCTTGAAGATAATCTGTCAACATCCGAGCAGCTGGCTTGTG GGGACGAGCAAAAAAGGAATGGTGCAGATTTGTTAGGCGCACCTACCCAA AGCATCTTTGCTTTATTGCAAGATAAAGCAGATTCTCTAGTA
52	fragmento del gen Comt	AATGCCCCCATCAAGGACTGCATCTTTTAGGTGGTACCAGCTTCCATGAG CACTTTATCCTGATTCATGAGATTAGAGCAGAAATGGATACACCATCTTC ATTCTTAACCAATACTTAGCAACAGTAGCCAAACCAATAAGTCTCTGAAC CTTCCATCTTGTGAGTACGAACCTGAACAGTGAAGATATTGTACACAGC CAGGAGACCGCAACATTCGGTCCACATAACTGGTGCATCAGGGTTAGTTGT TGGTAGCTGAGAAACAATTTCATAGGTGAAATTGAGGACCAAGCTCCAGA ATTCAATCTCACAAAACCTCATCAATCACAAACATGGGTTCACAGGTGA AACTCAATAACACCAACCCACATATCAGATGAAGAAGCAAACTCTTCCG CATGCACTAGCAAGTGCCTCAGTTCTTCCCATGATTTTGAAATCAGCTGT TGAACTTGATCTCTTAGAATCATTGGTAAAGC
53	Fragmento del gen Comt	AATGCCCCCATCAAGGACTGCATCTTTTAGGTGGTACCAGCTTCCATGAG CACTTTATCCTGATTCATGAGATTAGAGCAGAAATGGATACACCATCTTC ATTCTTAACCAATACTTAGCAACAGTAGCCAAACCAATAAGTCTCTGAAC CTTCCATCTTGTGAGTACGAACCTGAACAGTGAAGATATTGTACACAGC CAGGAGACCGCAACATTCGGTCCACATAACTGGTGCATCAGGGTTAGTTGT TGGTAGCTGAGAAACAATTTCATAGGTGAAATTGAGGACCAAGCTCCAGA ATTCAATCTCACAAAACCTCATCAATCACAAACATGGGTTCACAGGTGA AACTCAATAACACCAACCCACATATCAGATGAAGAAGCAAACTCTTCCG CATGCACTAGCAAGTGCCTCAGTTCTTCCCATGATTTTGAAATCAGCTGT TGAACTTGATCTCTTAGAATCATTGGTAAAGC
54	Promotor de Alfalfa	GGGCCCATAGTGGACCAAGTTAGGTAGGTGGAGAAAGAAATTATTAABAAA TATATTATATATGTTGTCAAAATAACTCAAAAATCATAAAGTTTAAGTTAGC AAGTGTGCACATTTTATTTGGGACAAAGTATTACCTACTACTCTTTATAA ATCATTATTAAACATTAGAGTAAAGAAATATGGATGATAAGAAATAGAGTA GTGATATTTTGACACAAATTTTGTAAACAACTTTGAGAAAATTTTGTGTTT CTCTCTTTTCAATTGCTCAAAAACAATAAGAGAGAGAGAGAGAAAAGGAAGA GGGAGATATAAAACATAATCTGAGTATGAGAGAGAGAGTTGTACAAAAGTT GTAGCAAAATGTTTGTACAAATATCATTTGAGGAATTTGACAAAAGCTACAC AAATAAGGTTAAATGCTGTAATAATAAAGGATGACGCATTAGAGAGATG TACCATTAGAGAAATTTTGGCAGTCAATTAABAAAGAAAGAAATTAATTTT TTAAATTAAGAGTTGAGTCAATTTGATTAACATGTGATTATTTAATGAAT TGATGAGAGAGTTGGATTAAAGTTGTATTAATGATTAGAAATTTGCTGTCAA ATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTTGCCCATAGAGTCATTT AATCATTTTATATTTTATAGATCAAAATAGAGAAATAACGGTATATTTAA TCCCTCCAAACAAAAAAGAAAAAAGCGTATATTTACTAATAAATCTAAG CCAGGTAGGAGGATAACATCCAAATCCAAACCAATCACAAATCTGATGAG ATAACCACTTTAAGCCCAAGCACTCTGTGGCAGATCTACATTTATCAAAAT CACACATCTCTCCAGACATCTGAGGACACAAABAAACCAATCCACATCTTTA TCATCCATTTCTATAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCT TCAAACACATACAAAGAGAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGA GAAGGC
55	Promotor de Alfalfa	AGAGAGGAGGCAGTGTACACAGGGCAGAGAGAGGTGAGTCTCTTCTG TAGGGCTGGTGTGGGGATAGTGGTTGGTTTGAAGTCAAGTGGTGGAGGAG GGTTGGCGATGGGTTGATACGTTGTTTTGGTTGGATAGGTGGTTAGGAGA TGCTCCCTTTTGTGTTTGTTCAGGAGGTTGTTTGAATTAACAGAGAACAA ATTGTGTCTGTGGCTAATTTGTTATCTGTGACTCGAGCAATGGGGGGA GGTGTGAGGTGAAGGCTATGGTGGCAGAGGTGGTGGCAGAGGTGAAGGCT ATGGTGGCAGCTGAGGGAGGCACTGTACACAGAGGTGAGAGAGAGGAGAG AGAGAGAGAGAGAGAGAGAAATGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG ACAAATTTTGTGTGTGTGACCAAAACCAAAATCTTGGTCTGTGTCCACAC AAGATTTTCTCCCAACGAGGTACAGAAATACCAAGTCCCAAGATGCCAC GTTGCACATCATAAACGTTCAATAGTAAGAGATTAATCGAACCGCCATAAT
		TAAATTTCAACAAACCACTTTTTCCTCTACTTTTCAACTTGTCCCTC ATCACCTACCAAAACACATAGCACAGCAACACATTAATATTAATTAAT BATTTGTAATATATGTAGCTCCAAATTAAGAAAGAACTCTATATTAAGC CTAATCTCTCTTCAAAATCAGAAATTCACAACTCTAATATTCATTTT TTCTCTATCATTAAGAAATTCATCTTTTAAAAATCTAGGTACCAACCA CAACAAATAAGGAATTAATCATACTATTAAAGAT

56	fragmento de ADN de alfalfa que funciona como alternativa para el borde izquierdo de Agrobacterium	CGGCAGGATGTATACAGAGGTATACAAATTTTATATTACATTTATATTGTG TTAATTCATTGAATTTTCACTTTTATTTTACTTTGATAATCAACTGTGT AAAGAATTATTTGAAAAATATATATAATTATATAGAAATTTTGTGTATG
57	fragmento de ADN de alfalfa que funciona como alternativa para el borde derecho de Agrobacterium	CTAGATTATGCGGGCTAACGGGCTGCCCGCGGCCCTTTCGGGCTAGCCCTA ACGGGTACCGGGCCCGGCAGGATGTATACAGAGGTATAC
58	ADN de transferencia entero de pSIM856	CGGCAGGATGTATACAGAGGTATACAAATTTTATATTACATTTATATTGTG TTAATTCATTGAATTTTCACTTTTATTTTACTTTGATAATCAACTGTGT AAAGAATTATTTGAAAAATATATATAATTATATAGAAATTTTGTGTATG GGGCCATAGTGGACCACTTAGGTAGGTGGAGAAAGAAATTTTAAAAAA TATATTTATATGTTCTCAATTAACCTCAAAATCATATAAAGTTTAACTTAGC AAGTGTGCACATTTTATTTTGGACAAAGTATTCACCTACTACTGTTATA ATCATTATTAAACATTAGAGTAAGAAATATGGAATGATAAGATAAGAGTA GTGATATTTGACAAACATTTTGTACAAACATTTGAGAAATTTGTGTGT CTCTCTTTTCACTGGTCAAAAACAAATAGAGAGAGAGAGAGAAAGGGA GGGAGATAAAACATAAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAGTT GTACCAAAATGGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAGCTACAC AAATAGGGTTAATTTGCTGTAATAAATAAGGATGACGCTATAGAGAGATG TACCATTAGAGAAATTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGATAAATTTATTT TTAAATTTAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTTTATGAAT TGATGAGAGAGTTGGATTAAAGTTGATTAAATGATTAAGATTTGGTGTCAA ATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGAGTCATTT AACTCATTTTATATTTTATAGATCAAAATAGAGAAATAACGGTATATTA TCCCTCCACAAAAAAGAAAAAAGCGGTATATTTACTAAAAAATCTAAG CCAGGTAGGAGGATAACATCCAAATCCAACCAATCACACCAATCTGTATGAG ATACCCACTTTAAGCCGACGCACTCTGTGGACATCTACATTAATCAAAAT CACACATTTCTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTA TCATCCATTTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTGTATCCCT TCAACACATACAAAGAGAAAGGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGA GAAAGCCCTGGAAGATGCCCCATCAAGGACTGCATCTTTTAGGTGTACC AGCTTTCATGAGCACTTTATCCTGATTATGAGATTAAAGAGAGAAATGG
59		ATACACCATCTTCATTCTTAACCAAACTTAGCAACAGTAGCCAAACCAT AAAGTCTCTGAACCTTTCCATCTTGTGAGTACGAAGTGAACAGTGAGGA TATTTGTAACAGCCAGAGACGCAACATTCGGTCCAACATAACTGGTGCAT CAGGTTAGTTTGGTAGCTGAGAAGCAATTTCAATAGGTGAAATTTGAG CACCAGTCCAGCTTTAGCAATGATTTCTAAGAGATCAAGTTCAAGAGCTG ATTTCAAAATCATGGGAAGAACTGAAGCACTTGCTAGTTGCATGGCAGAA GGTTTGCTTCTTCATCTGATATGTGGGTTGGTGTATTTGAGTTTCACCTG TTGAACCATGAGTTGTGATTGATGAGGTTTGTGAGATTGAATTTCTGGAC CTGGTGCTCAAATTTCACTTATGAAATTTGCTTCTCAGCTACCAACAACTA ACCTGATGCACAGTTATGTTGGACCGAATGTTGCGTCTCTTGGCTTGT ACAATATCCTCATTGTTTCACTTCTGATCAACAAGATGGAAAGGTTTCA GACTTTATGGTTTGGCTACTGTTGCTAAGTATTTGGTTAAGAAATGAAGATG GTGATCCATTTCTGCTCTTAATCTCATGAATCAGGATAAAGTGTCTATGG AAAGCTGGTACCACCTAAAAGATGCAGTCTTTGATGGGGGCAATGGATCCA TCTTAATAGTATTGATTAAATGTTCTTTATTTGTTGTGTGGTGGTACCTAG AATTTTATAAGAATGGAAATTTCAATGATTAGGAAAGAAATGAATATTAGA GTTGTGAATTTCTGATTTGTGAAGGAAGTATTTAGGCTTTATATAGAGGT TTCTTTCTAATTTGGAGGCTACATATATTTACAATATTATAAATATTATTA TGTGTGTTGGTGTGCTATGTGTGTTGGTAGGTGATGAGGACAAAGTTGCA AAAGTAGGAGGAAAAAGTGGGTTTGTGAAATTAATTAATGGCCGTTTCA TTATCTCTTACTATTGAACGGTTATGATGTTGCAACGTGGCACTCTTGGAT CGTGGTATTCTGTACCTTTGGTTGGGAGAAATCTTGTGTGGACCAAGACC AAGAATTTTGGTTTGGTCACACACACAAAAATTTGTCTTCTCTCTCTCTC TTCTCTCTCTCTCCATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC ACCTCTGTGTACACTGCTTCCCTCAGCTGCCACCATACGCTTCACTCTGC CACCACCTCTGCCACCATACGCTTCACTCAACACCTCCCCCACTGCTCC GAGTCAACAGATAACAAATTAGCCACAGACACAAATTTGTCTCTGTGTTAAC TCAAAACACCTCCTGAAACAAACACAAAAGGAGCATCTCCTAACCCCTA TCCAACCAAAACACGTATCAACCCCATCGCCCAACCTCCTCACCACCTGA CTCTCAAAACCAACCACTATCCCAACACCAAGCCCTACAGAAAGACGACTC ACCTCTCTCTGCCCTGTGTACACTGCTTCTCTCTCTAGATTATGCGGGC TAACGGGCTGCCCGCGGCCCTTTCGGGCTAGCCCTAACGGGTACCGGGCCC CGGCAGGATGTATACAGAGGTATAC

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

59	Promotor COMT de maíz	TTCCACGGCAGCTGCCACCGTCGCTATCGCTGACCAACCCGGCTGGTCGCC TCTGTGCTCCATCCATGCATGTTAQAACATATGCAGATGCAGCCGAAACAAA CACTGGCTAGAAAGGCAGCCCAACGGGCTACTGTCATTGCTCCGGCATC CTACTGGTGGGCCCCTTGACCGGGCCGATGACCAGTTCATCATTTTTCTC GACGAATTTGTGCACAGAATTGCTAAAAATTCTTCGCACGTGGCAAAACC AGGGGGAAAATCGACAACCTAGTCGGGGTTTTTTTAATCCCTGATAGAATA GTCCCTGCTAATCATCCATGAAAACCAACACGTA CTCTACGTACCCGTCA TGGATGGAGCGAGTGAACCTGATGATTTTTTCCCATCCCGCACGCAACAGC ATGGGTGACAACAACCACTCCCGCTGCGGTGGGCGAGCACATCTCTACGC ACTTGACACTCAGCAAACCTAACGCATACTAGAGTAATCATCGCCACCAA CTATCGGCGACAGAAACGATGGGCCCGCTTCTTTAATCACGGTGCTTGA ATTAGTGCGCGCATAGTAGTGAAAAATAAGTGAATAAAGCAGTGCGT GTTTTGGTGTTGGTGGTGAGCCGTCCGCCCAATAAAACCCCTCGCA CCACCTCGTCCCT
----	--------------------------	--

REIVINDICACIONES

1. 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 ni el primero ni el segundo polinucleótido se enlaza operativamente a un terminador, en donde dicho constructo produce moléculas de ácido nucleico que previenen o reducen la expresión de un gen o de un producto génico, y en donde (a) el primer polinucleótido comprende una secuencia de al menos 23 nucleótidos contiguos que comparte identidad de secuencia con un gen objetivo un elemento regulador que se asocia con el gen objetivo, un exón del gen objetivo, un intrón del gen objetivo, una región 5'-no traducida del gen objetivo, y/o la región 3' no-traducida del gen objetivo, (b) el segundo polinucleótido está orientado como una copia de repetición invertida del primer polinucleótido, y (c) el primer promotor y el segundo promotor se orientan para introducir transcripción convergente del primer polinucleótido y el segundo polinucleótido.
2. El constructo de la reivindicación 1, en donde ni el primero ni el segundo polinucleótido se enlaza operativamente a (i) un gen terminador nos, (ii) la secuencia 3' no-traducida del gen T-ADN 7, (iii) la secuencia 3' no-traducida del principal gen de inclusión de la proteína corporal del virus del mosaico de la coliflor, (iv) las secuencias 3' no-traducidas de la subunidad menor de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa de chícharo, (v) las secuencias 3' no-traducidas del gen ubiquitina-3 de la papa, o (vi) las secuencias 3' no-traducidas del gen inhibidor de proteinasa II de la papa, (vii) las secuencias 3' no-traducidas de los genes de opina (viii) las secuencias 3' no-traducidas de genes endógenos.
3. El constructo de la reivindicación 1, en donde el gen objetivo es un gen COMT implicado en la biosíntesis de lignina, un gen CCOMT implicado en la biosíntesis de lignina, cualquier otro gen implicado en la biosíntesis de lignina, un gen R1 implicado en la fosforilación del almidón, un gen fosforilasa implicado en la fosforilación del almidón, un gen PPO implicado en la oxidación de los polifenoles, un gen poligalacturonasa implicado en la degradación de la pectina, un gen implicado en la producción de alérgenos, un gen implicado en la biosíntesis de ácido graso tal como FAD2.
4. El constructo de la reivindicación 1, en donde el primer y segundo promotores son funcionales en una planta y en donde el casete de expresión se ubica entre secuencias bordes del ADN de transferencia de un plásmido que es adecuado para la transformación de la planta mediada por bacteria, en donde la bacteria es una cepa de *Agrobacterium*, *Rhizobium*, o *Phyllobacterium*.
5. El constructo de la reivindicación 1, que además comprende un polinucleótido separador posicionado entre el primer y segundo polinucleótidos, en donde el polinucleótido separador es 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 largo.
6. El constructo de la reivindicación 1, en donde el primer promotor es un promotor constitutivo, un promotor constitutivo cercano, un promotor específico de tejido, o un promotor inducible y en donde el segundo promotor es un promotor constitutivo, un promotor constitutivo cercano, un promotor específico de tejido, o un promotor inducible.
7. Un plásmido de transformación que comprende el constructo de la reivindicación 1, en donde el plásmido de transformación comprende un casete de expresión, que comprende en la orientación 5' a 3' (1) un primer promotor que se enlaza operativamente a (2) un primer polinucleótido deseado, que limita con (3) al menos un polinucleótido separador opcional, donde el extremo 3' de uno de los polinucleótidos separadores limita con (4) un segundo polinucleótido deseado, que se enlaza operativamente a (5) un segundo promotor, en donde ningún polinucleótido deseado en el casete de expresión se enlaza operativamente a cualquier terminador de la transcripción, en donde dicho constructo produce moléculas de ácido nucleico que previenen o reducen la expresión de un gen o de un producto génico, y en donde el segundo polinucleótido deseado está orientado como un complemento inverso del primer polinucleótido deseado.
8. El plásmido de transformación de la reivindicación 7, en donde (a) al menos parte del primer polinucleótido deseado está en la orientación antisentido; o (b) al menos parte del primer polinucleótido deseado está en la orientación

sentido; o (c) al menos parte del primer polinucleótido deseado de (a) o (b) es una secuencia del promotor o comparte identidad de secuencia con una secuencia del promotor.

- 5 9. El plásmido de transformación de la reivindicación 8, en donde la secuencia de (c) comparte identidad de secuencia con un promotor que se asocia con un gen endógeno y se selecciona del grupo consistente de (1) un promotor del gen R1 asociado al almidón, (2) un promotor del gen polifenol oxidasa, (3) un promotor del gen ácido graso desaturasa 12, (4) un promotor del gen microsomal ácido graso omega-6 desaturasa, (5) un promotor del gen delta 9 portador de esteroilacil-desaturasa de algodón, (6) un promotor del gen oleoilfosfatidilcolina omega 6-desaturasa, (7) un promotor del gen ácido cafeico/ácido 5-hidroxiferulico 3/5-O-metiltransferasa (COMT) de Medicago truncatula, (8) un promotor del gen ácido cafeico/ácido 5-hidroxiferulico 3/5-O-metiltransferasa (COMT) de Medicago sativa (alfalfa), (9) un promotor del gen cafeoil CoA 3-O-metiltransferasa (CCOMT) de Medicago truncatula, (10) un promotor del gen cafeoil CoA 3-O-metiltransferasa (CCOMT) de Medicago sativa (alfalfa), (11) un gen COMT de Zea mays (maíz), (12) un promotor del gen del alérgeno principal de manzana Mal d 1, (13) un promotor del gen del alérgeno principal del cacahuete Ara h 2, (14) un promotor del gen del alérgeno principal del frijol de soja Gly m Bd 30 K, (15) un promotor del gen poligalacturonasa, (16) cualquier otro promotor endógeno.
10. El plásmido de transformación de la reivindicación 9, en donde (1) (i) al menos uno del primer y segundo promotores es un promotor GBBS y (ii) el primer polinucleótido deseado es una secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos una parte de un promotor asociado con un gen polifenol oxidasa; (2) tanto el primero como el segundo promotores son promotores GBBS; o (3) el primer promotor es un promotor GBBS y el segundo promotor es un promotor AGP.
11. Un método para reducir la expresión de un gen normalmente capaz de expresarse en una célula de planta, que comprende exponer una célula de planta al constructo de la reivindicación 1, en donde el constructo se mantiene en una cepa bacteriana, seleccionada del grupo consistente de *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Phyllobacterium myrsinacearum*, *SinoRhizobium meliloti*, y *MesoRhizobium loti*, en donde el polinucleótido deseado comprende una secuencia que comparte identidad de secuencia con una secuencia objetivo en el genoma celular de la planta.
12. El constructo de la reivindicación 1, que comprende un casete de expresión que comprende en la orientación de 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 de promotor asociada con un gen objetivo, (iii) un segundo polinucleótido que comprende una secuencia que comparte identidad de secuencia con el complemento inverso de al menos parte del promotor asociado con el gen objetivo, y (iv) un segundo promotor, en donde el primer promotor se enlaza operativamente al extremo 5' del primer polinucleótido y el segundo promotor se enlaza operativamente al extremo 3' del segundo polinucleótido, en donde dicho constructo produce moléculas de ácido nucleico que previenen o reducen la expresión de un gen o de un producto génico, y en donde ni el primero ni el segundo polinucleótido se enlaza operativamente a un terminador, y en donde el segundo polinucleótido está orientado como un complemento inverso del primer polinucleótido.
13. Un plásmido de transformación de planta que comprende el constructo de la reivindicación 1, en donde el plásmido de transformación de planta, comprende la secuencia descrita en la sec. con núm. de ident.: 40 o 42.
14. Un método para reducir el endulzamiento inducido por frío en un tubérculo, que comprende expresar el constructo de la reivindicación 1 en una célula de un tubérculo, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos una parte de un gen R1 o con al menos una parte de un promotor del gen R1, (c) uno o ambos de los primero y segundo promotores son GBBS o AGP, y (d) expresión del constructo en la célula reduce la transcripción y/o traducción de un gen R1 en un genoma celular de tubérculo, reduciendo así el endulzamiento inducido por frío en el tubérculo.
15. El método de la reivindicación 14, en donde el primer polinucleótido comprende la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 23 o 24.
16. Un método para mejorar la tolerancia a la mancha negra por magullamiento en un tubérculo, que comprende expresar el constructo de la reivindicación 1 en una célula de un tubérculo, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos parte de un gen polifenol oxidase expresado en un tubérculo un promotor de un gen polifenol oxidase expresado en un tubérculo, (c) uno o ambos de

los primero y segundo promotores son GBSS o AOP, y (d) y expresión del constructo en la célula reduce la transcripción y/o traducción de un gen polifenol oxidase en un genoma celular de tubérculo, mejorando así la tolerancia del tubérculo a la mancha negra por magullamiento.

- 5 **17.** El método de la reivindicación 16, en donde el primer polinucleótido comprende la secuencia de sec. con núm. de ident.: 26 o 27.
- 10 **18.** Un método para aumentar los niveles de ácido oleico en una planta que porta aceite, que comprende expresar el constructo de la reivindicación 1 en una célula de una semilla de una planta que porta aceite, en donde (a) el primer polinucleótido comprende una secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos una parte de un gen Fad2 o un promotor del gen Fad2, (c) uno o ambos de los primero y segundo promotores son gen nabo, el gen Fad2, o promotores del gen estearoil-ACP desaturasa, y (d) 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 que porta aceite, aumentando así el contenido de aceite de la semilla.
- 15 **19.** El método de la reivindicación 18, en donde (i) el primer polinucleótido comprende la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 28 o una secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos una parte de la sec. con núm. de ident.: 28; o (ii) la secuencia la secuencia del promotor del gen nabo comprende la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 30; o (iii) la secuencia del promotor del gen estearoil-ACP desaturasa comprende la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 31; o (iv) la secuencia del promotor del gen Fad2 comprende la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 32, o permutaciones de (i)-(iv) existentes en el constructo.
- 20 **20.** El método de la reivindicación 19, en donde la planta portadora de aceite es una planta *Brassica*, planta de canola, planta de frijol de soja, planta de algodón, o una planta de girasol.
- 25 **21.** Un método para reducir el contenido de lignina en una planta, que comprende expresar el constructo de la reivindicación 1 en una célula de la planta, en donde (a) el primer polinucleótido comprende una secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos parte de la secuencia del promotor asociada a un gen seleccionado del grupo consistente del gen de ácido cafeico/ácido 5-hidroxiferulico 3/5-O-metiltransferasa (COMT) y gen cafeoil CoA 3-O-metiltransferasa (CCOMT), (c) uno o ambos de los primero y segundo promotores son promotores de genes petE o Pal, y (d) expresión del constructo en la célula reduce la transcripción y/o traducción de un gen COMT o CCOMT en la célula de la planta, reduciendo así el contenido de lignina en una planta.
- 30 **22.** El método de la reivindicación 21, en donde la planta es una planta de alfalfa y en donde el primer polinucleótido comprende al menos una parte de la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 33 o 37.
- 35 **23.** Un método para reducir la degradación de la pectina en un fruto de una planta, que comprende expresar el constructo de la reivindicación 1 en una célula fruto de la planta, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia de una parte del gen de la poligalacturonasa, (c) ambos de los primero y segundo promotores son promotores específicos de la fruta, y (d) expresión del constructo en la célula de fruta reduce la transcripción y/o traducción de un gen de la poligalacturonasa en la célula de la planta, reduciendo así la degradación de la pectina en el fruto.
- 40 **24.** El método de la reivindicación 23, en donde el primer polinucleótido comprende la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 39 o al menos una parte de la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 39.
- 45 **25.** Un método para reducir la alergenicidad de un alimento producido por una planta, que comprende expresar el constructo de la reivindicación 1 en una célula de una planta, en donde (a) el primer polinucleótido comprende la secuencia de una parte de un gen que codifica un alérgeno, y (c) la expresión del constructo reduce la transcripción y/o traducción del alérgeno, reduciendo así la alergenicidad de un alimento producido por la planta.
- 50 **26.** El método de la reivindicación 25, en donde (1) (a) la planta es una planta de manzana, (b) la comida es una manzana, (c) el primer polinucleótido comprende una secuencia del promotor del gen Mal d I, y (d) la expresión del constructo en una planta de manzana reduce la transcripción y/o traducción de Mal d I en la manzana; o (2) (a) la planta es una planta de cacahuete, (b) la comida es un cacahuete, (c) el primer polinucleótido comprende una secuencia del promotor del gen de Ara h 2, y (d) la expresión del constructo en el planta de cacahuete reduce la
- 55

transcripción y/o traducción de Ara h 2 en el cacahuete; o (3) (a) la planta es una planta de frijol de soja, (b) la comida es un frijol de soja, (c) el primer polinucleótido comprende una secuencia del promotor del gen Gly m Bd, y (d) la expresión del constructo en el planta de frijo de soja reduce la transcripción y/o traducción de Gly m Bd en el frijol de soja.

27. Un método para la regulación negativa de la expresión de múltiples genes en una planta, que comprende expresar en una célula de una planta (1) un constructo que comprende la secuencia que comparte identidad de secuencia con al menos parte de la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 40, que regula negativamente la expresión del gen de la polifenol oxidasa, fosforilasa L, y el gen R1 en la célula vegetal; o (2) un constructo que comprende la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 42, que regula negativamente la expresión del gen de la polifenol oxidasa, gen fosforilasa L, y gen R1 en la célula vegetal.
28. El método de la reivindicación 19, en el que el primer polinucleótido comprende una secuencia con homología a (i) al menos parte de la secuencia representada en la sec. con núm. de ident.: 28; o (ii) al menos parte de la secuencia del promotor asociado con el gen nabo que se representa en la sec. con núm. de ident.: 30; o (iii) al menos parte de la secuencia del promotor del gen estearoil-ACP desaturasa se representa en la sec. con núm. de ident.: 31; o (iv) al menos parte de la secuencia del promotor del gen Fac2 representada en la sec. con núm. de ident.: 32, o permutaciones de (i) - (iv) existentes en el constructo.

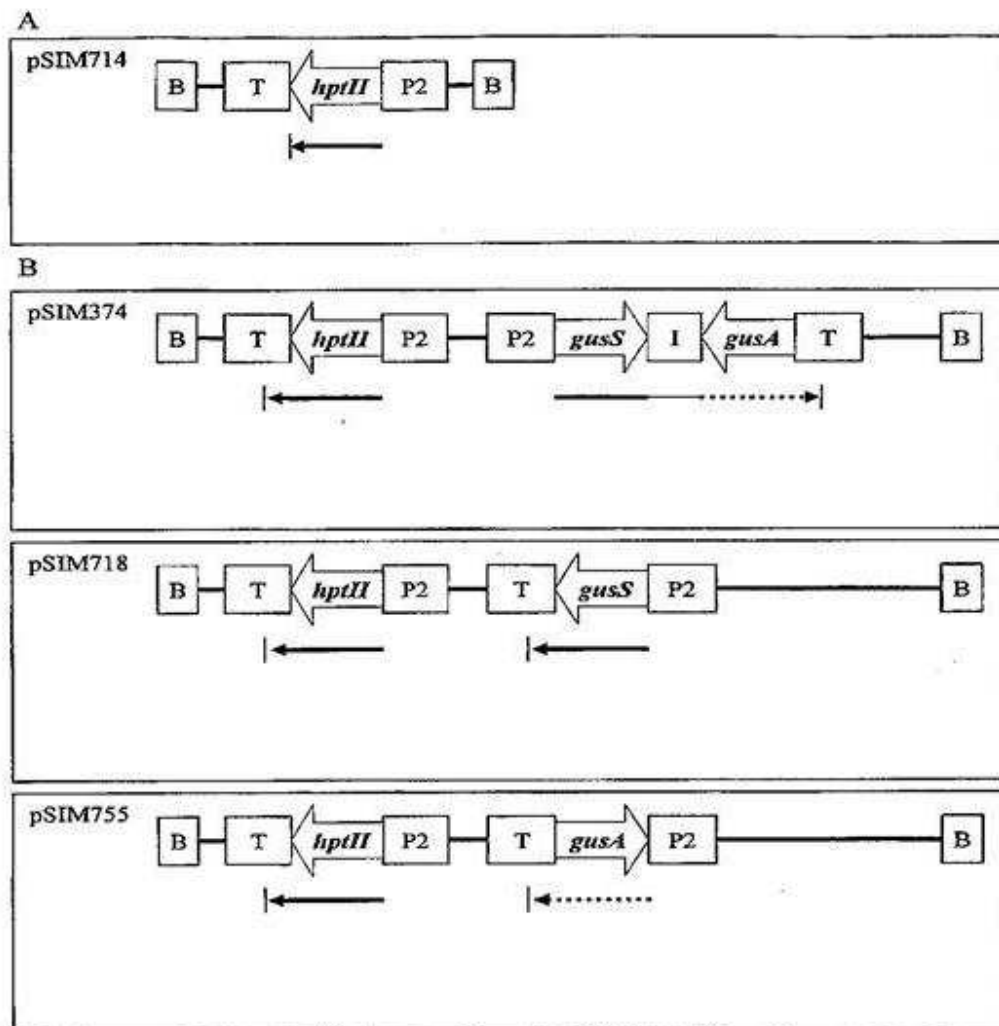


Figura 1

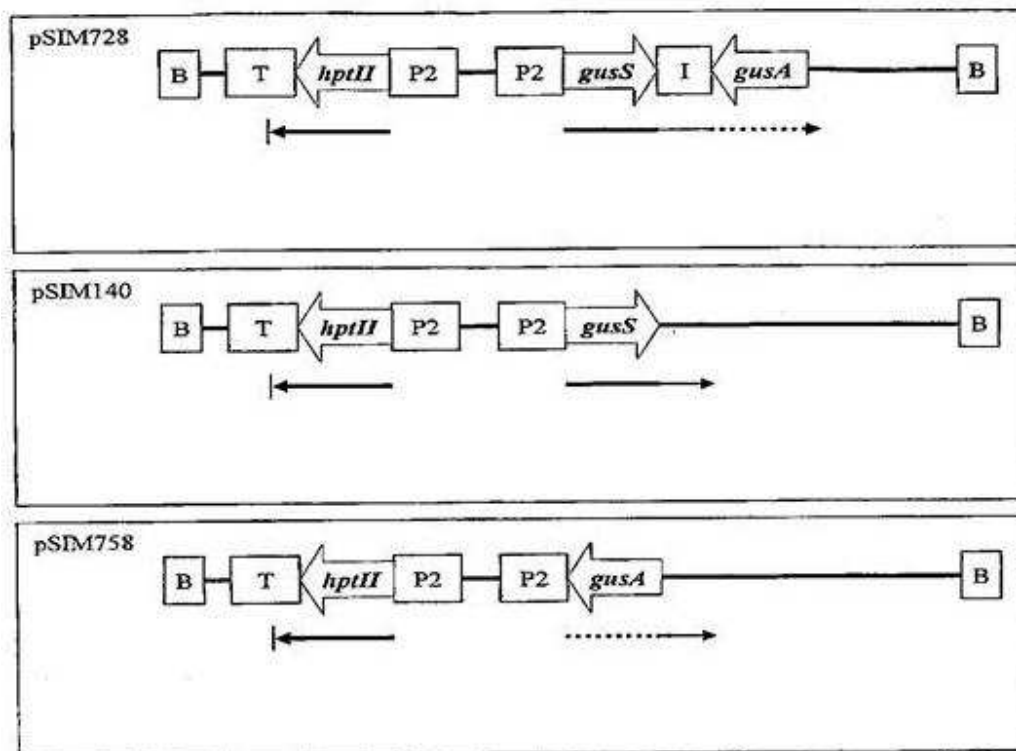


Figura 2

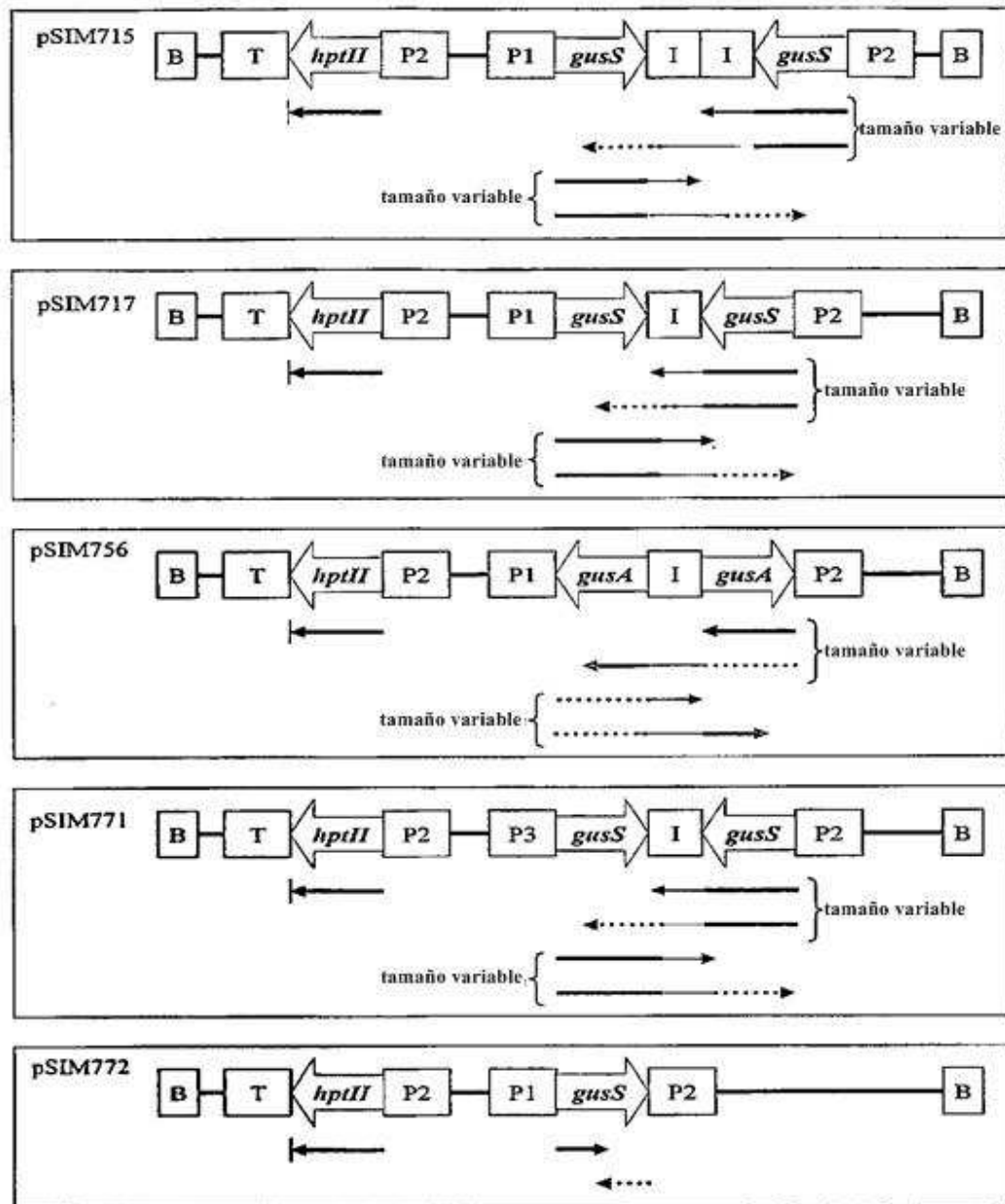


Figura 3

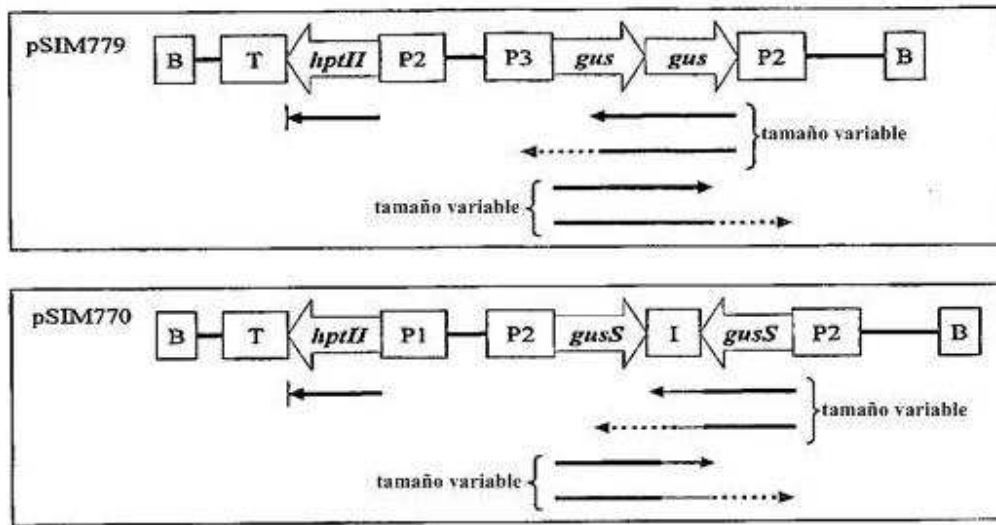


Figura 3 (continuación)

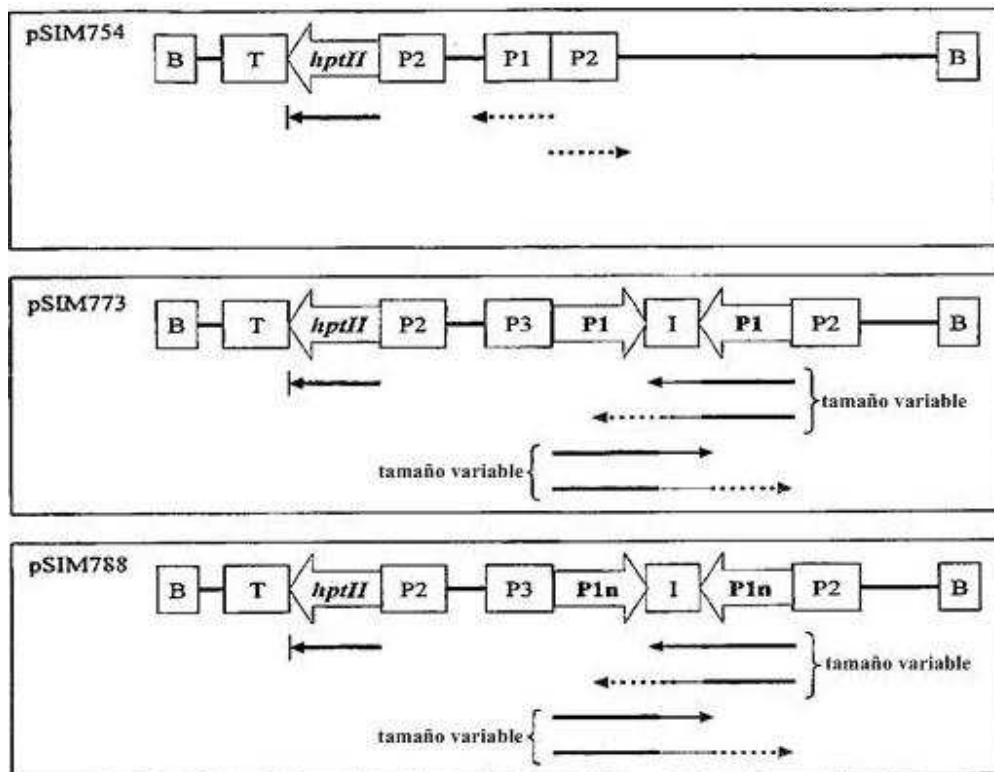


Figura 4

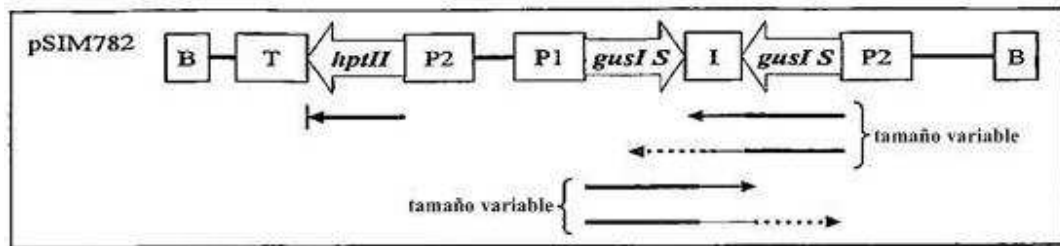


Figura 5

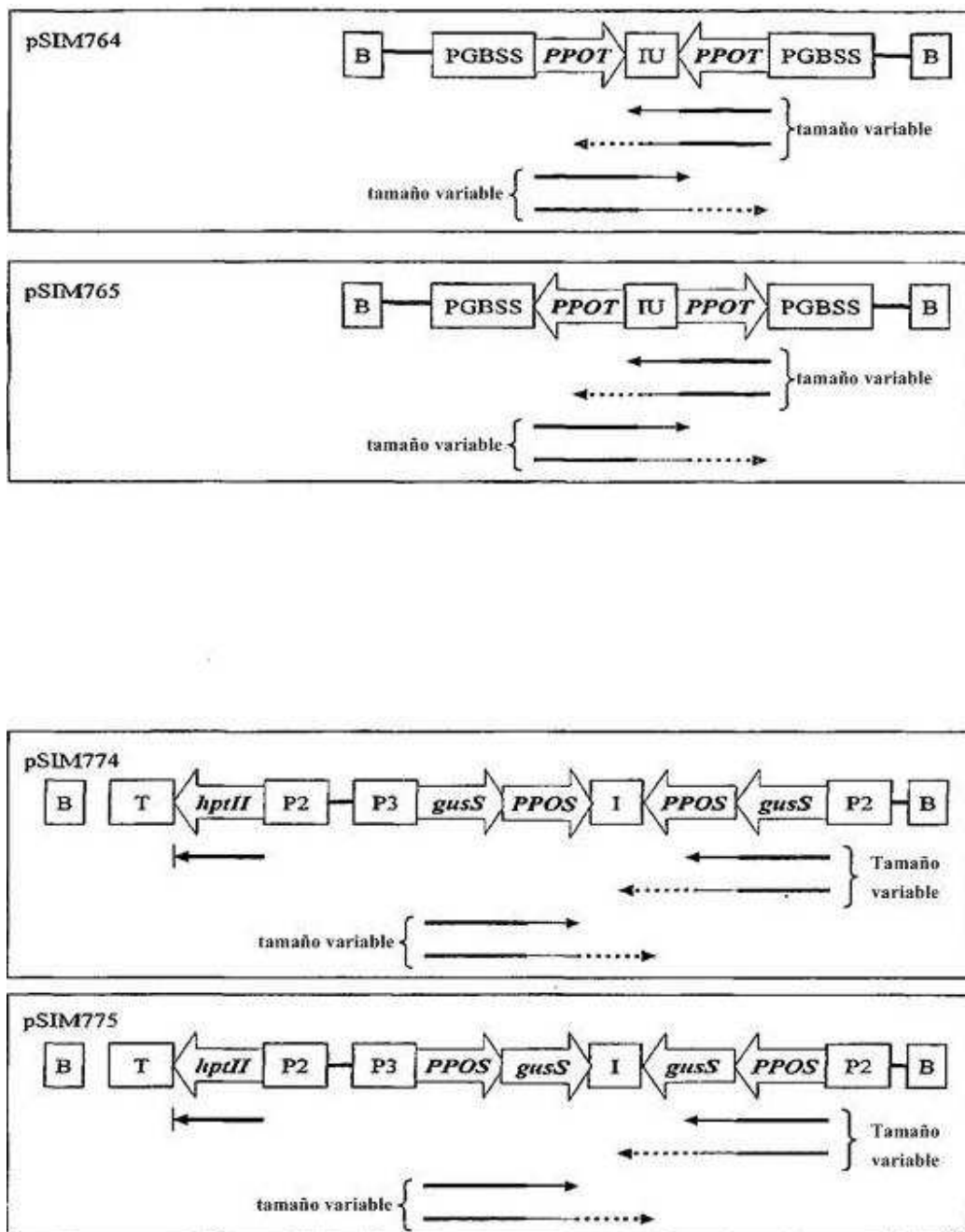


Figura 6

Figura 7

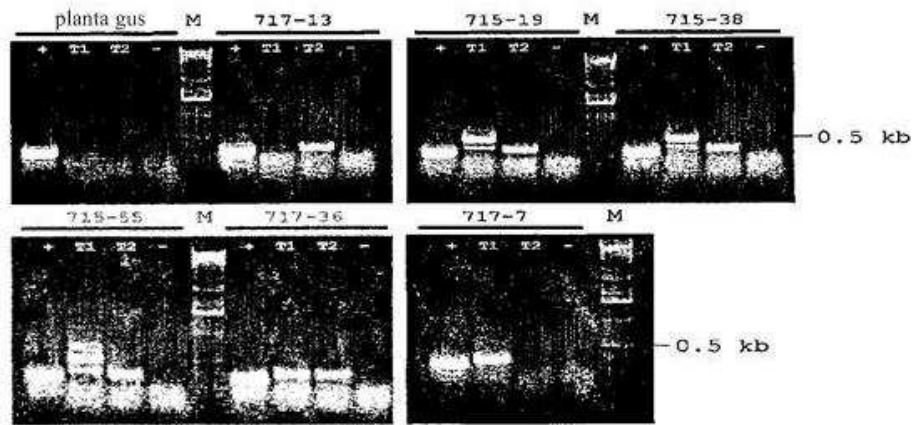


Figura 8

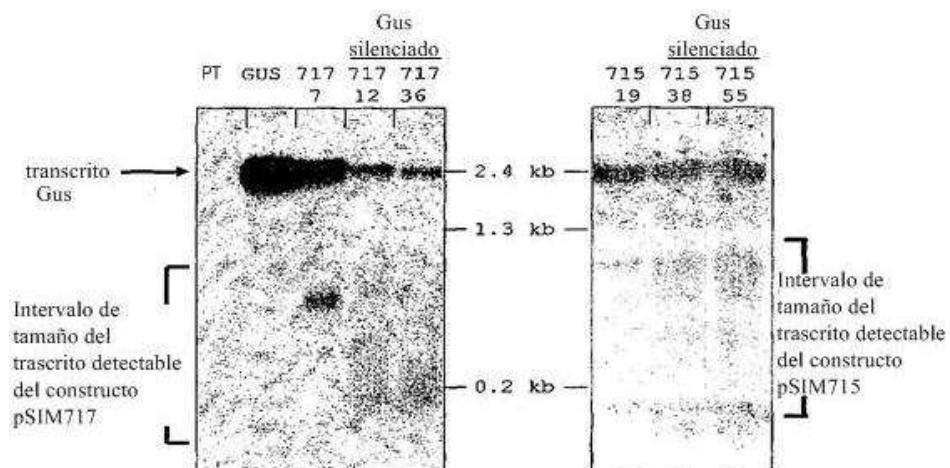


Figura 9

Parte del promotor P1 que facilita el silenciamiento génico

CAAGTGGGGAACAAAATAACGTGGAAAAGAGCTGTCCTGACAGCCCACTCÁCTAATGCGTATGACGAACGCAGTGAC
GACCACAAAAGA (SEQ ID NO: 60)

FIGURA 10

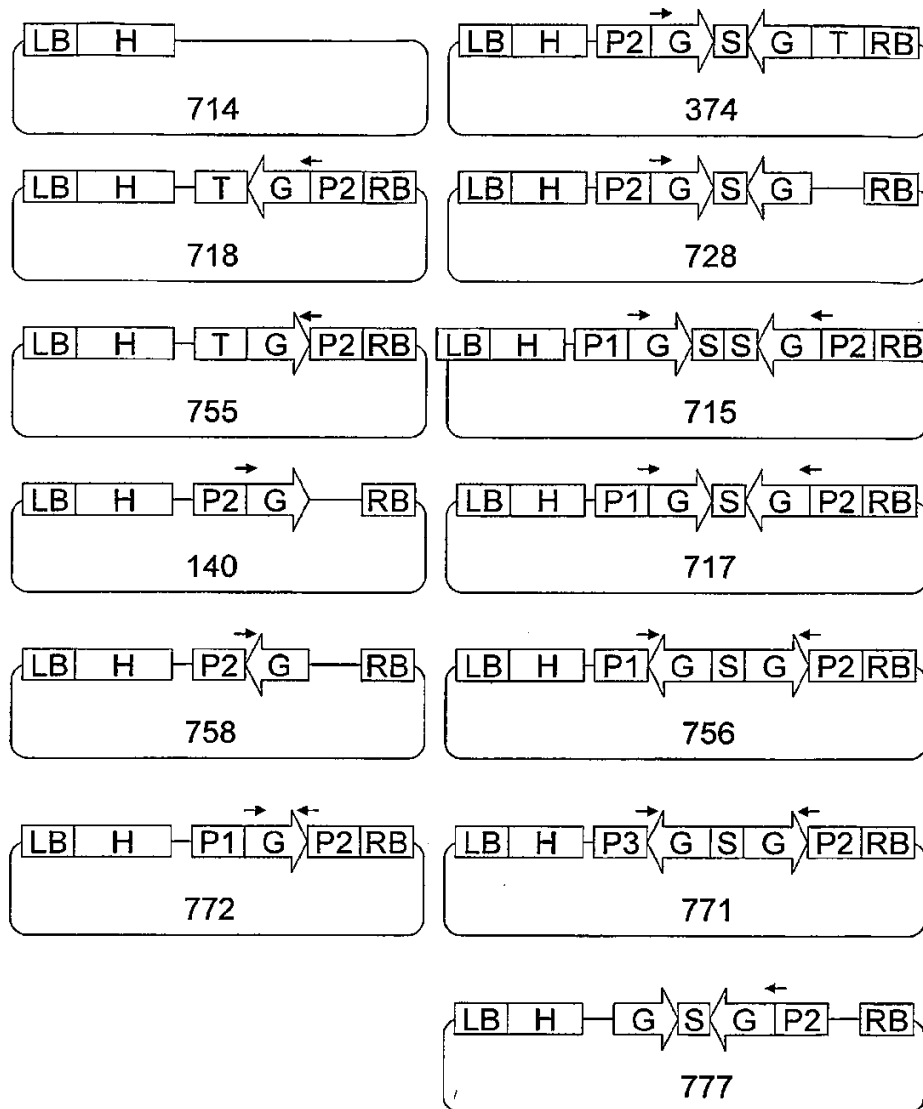


FIGURA 10 (CONTINUACIÓN)

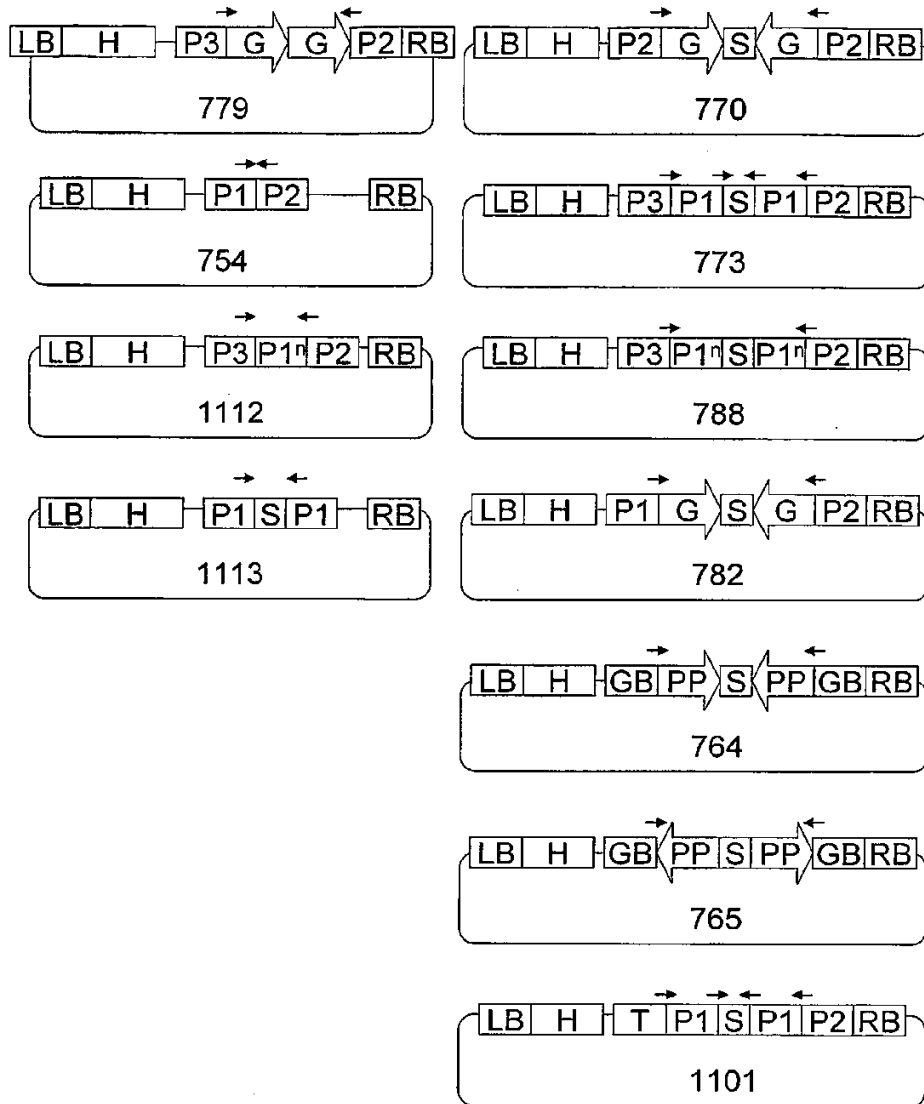


FIGURA 10 (CONTINUACIÓN)

