

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 549**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.1999** **E 10183703 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017** **EP 2267139**

54 Título: **Métodos y medios para obtener fenotipos modificados**

30 Prioridad:

**08.04.1998 US 56767**  
**03.08.1998 US 127735**

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

**14.07.2017**

73 Titular/es:

**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL  
RESEARCH ORGANISATI (100.0%)  
Black Mountain Science and Innovation Par,  
Clunies Ross Street  
Acton ACT 2601, AU**

72 Inventor/es:

**WATERHOUSE, PETER;  
WANG, MING BO y  
GRAHAM, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 624 549 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

Métodos y medios para obtener fenotipos modificados

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a métodos para reducir la expresión fenotípica de una secuencia de ácido nucleico de interés en células vegetales, al proveer simultáneamente a las células de genes quiméricos que codifican moléculas de ARN de sentido y antisentido que comprenden secuencias nucleotídicas respectivamente homólogas y complementarias a al menos parte de la secuencia nucleotídica del ácido nucleico de interés. Las moléculas de ARN de sentido y antisentido se pueden proporcionar como una molécula de ARN, en donde el ARN de sentido y antisentido pueden estar enlazados por una secuencia nucleotídica espaciadora y son capaces de formar una molécula de ARN de doble hebra. En un aspecto de la invención, los métodos se dirigen a reducir la infección viral, dando como resultado una resistencia a los virus extrema. En otra realización, los métodos se dirigen a reducir la expresión fenotípica de un gen endógeno en una célula vegetal. También se proporcionan células vegetales que comprenden tales moléculas de ARN. así como plantas que consisten esencialmente en tales células vegetales.

**Antecedentes de la invención**

15 En 1985, Sanford y Johnston propusieron el concepto de resistencia derivada de parásitos. Postularon que productos génicos clave procedentes de un parásito expresados en el hospedador en una forma disfuncional, en exceso o en un estadio de desarrollo incorrecto, deben alterar la función del parásito con efecto mínimo sobre el hospedador (Sanford & Johnston, 1985). Usando el bacteriófago QB como un modelo, propusieron que la expresión, en bacterias, de la proteína de envuelta del bacteriófago o la replicasa modificada o un ARN antisentido complementario al genoma de QB podrían dar todos resistencia. También propusieron que tales enfoques serían aplicables, en plantas, a virus de plantas y particularmente al uso de una replicasa de virus de planta modificada. La expresión de la proteína de envuelta del virus de planta, el virus del mosaico del tabaco (TMV), en tabaco fue la primera validación práctica de este concepto para resistencia a virus de plantas. Este trabajo (Powell-Abel y cols., 1986) mostraba que la expresión de la proteína de envuelta del TMV, a partir de un transgén bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, confería a las plantas resistencia a TMV. El mismo grupo (Powell y cols., 1990) mostró que, generalmente, las plantas que expresaban niveles superiores de proteína de envuelta eran más resistentes al TMV que las plantas que expresaban niveles bajos. Desde esta demostración, ha habido muchos ejemplos de plantas transformadas con genes de proteína de envuelta del virus que muestran resistencia (Tabla 1). También ha habido un número de informes de resistencia a virus de plantas en plantas que expresan replicasa silvestre (Braun y Hemenway, 1992, Brederode y cols., 1995), replicasa truncada (Carr y cols. 1992), replicasa modificada (Longstaff y cols. 1993) o ARN viral antisentido (Kawchuck y cols. 1991).

35 En 1992, Dougherty y colaboradores usaron diferentes formas del gen de proteína de envuelta del virus del grabado del tabaco (TEV) y descubrieron que algunas plantas que contienen genes de proteína de envuelta "de sentido" no traducibles y genes de proteína de envuelta antisentido mostraban resistencia extrema (ER) al virus (Lindbo & Dougherty, 1992 a,b). Esta resistencia era funcional a nivel de la planta entera y a nivel de células individuales. El TEV era incapaz de replicarse en protoplastos derivados de plantas con ER pero se replicaba hasta niveles altos en protoplastos procedentes de tabaco no transgénico. Dougherty y cols. concluyeron que el mecanismo que crea la resistencia extrema para la construcción de sentido no traducible no era el mismo que la estrategia mediada por proteínas de envuelta a menudo presentada. Propusieron que el ARNm de la construcción de sentido no traducible se hibridaba con el genoma de sentido mínimo del virus e interfería con la serie de complejos de replicación sobre la hebra negativa. Sugirieron que se debe evitar el uso de una secuencia viral que pudiera formar un apareamiento intramolecular ya que esto interferiría con su capacidad para hibridarse al ARN viral diana.

45 Tabla 1: Especies de planta que se han manipulado genéticamente para resistencia a virus (de Rebecca Grumet, Hort Science 30[3] 1995)

Especie	Virus
Tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.)	AIMV, ArMV, CMV, PVX, PVY, TEV, TGMV, TMV, TRV, TSV, TSWV
Otras especies de <i>Nicotiana</i> ( <i>N. debneyii</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>N. clevelandii</i> )	ACMV, BYMV, CyMV, CyRSV, BCTV, PEBV, PPV, PVS, WMV
Patata ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	PI, RV, PVY
Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> L.)	AIMV, CMV, TMV, TYLCV
Pepino ( <i>Cucumis sativus</i> L.)	CMV
Melón ( <i>Cucumis melo</i> L.)	CMV, ZYMV

Especie	Virus
Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.)	AIMV
Papaya ( <i>Carica papaya</i> L.)	PRSV
Maíz ( <i>Zea mays</i> L.)	MDMV
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	RSV
Colza ( <i>Brassica napus</i> L.)	TYMV

El grupo de Dougherty extendió sus investigaciones a plantas que contenían genes de proteína de envuelta del virus Y de patata (PVY) de sentido no traducibles. Obtuvieron resultados similares a aquellos con TEV y mostraron que las plantas con ER tenían un alto número de copias del transgén, una transcripción muy activa de los transgenes y bajos niveles de ARNm en estado estacionario procedente del transgén de PVY (Lindbo y cols. 1993, Smith y cols. 1994). Se propuso el siguiente modelo para este mecanismo de la resistencia: el alto nivel de transcripción del transgén viral activa un sistema de vigilancia celular postranscripcional basado en el citoplasma que se dirige a los ARN específicos para la eliminación. Cuando el transgén codifica un transcrito que comprende secuencias virales, el mecanismo no solo degrada el ARNm del transgén sino también las mismas secuencias en el ARN genómico viral. Un punto clave en este modelo es la necesidad de un alto nivel de transcripción del transgén proporcionado por un alto número de copias (3-8; Goodwin y cols. 1996). Alternativamente, el umbral del ARN requerido para activar el mecanismo se puede alcanzar mediante un nivel de transcripción moderado ayudado por el ARN viral procedente de la replicación en la infección inicial. Esto da lugar a un "fenotipo de recuperación" donde la planta se infecta inicialmente y muestra síntomas, pero a continuación produce nuevo crecimiento sin síntomas virales y que son extremadamente resistentes a la infección.

Esta propuesta era sustanciada por los hallazgos de que la inactivación génica de transgenes no virales también se podría deber a un mecanismo postranscripcional (Ingelbrecht y cols. 1994; de Carvalho Niebel y cols. 1995) que funciona al nivel del ARN.

Se proporcionó una relación entre la inactivación de genes no virales y esta resistencia derivada del patógeno al inocular plantas transgénicas, en la que se sabía que un transgén de GUS era inactivado por un mecanismo postranscripcional, con un virus que contiene secuencias de GUS (English y cols. 1996). En esta situación las plantas eran extremadamente resistentes a la infección viral. Sin embargo, las mismas plantas eran sensibles al virus si no contenían secuencias de GUS.

El grado de resistencia viral no siempre está directamente relacionado con el nivel de transcripción del transgén viral (Mueller y cols. 1995; English y cols. 1996) sugiriendo que puede haber un mecanismo alternativo para inducir la resistencia. Para ajustarse a estas discrepancias, se ha proporcionado un modelo alternativo en el que el factor crucial que afecta a la resistencia no es el nivel sino la calidad del ARNm del transgén (English y cols. 1996). Según este modelo, el transgén sólo puede inducir resistencia (o inactivación génica) si se transcribe para producir ARN "aberrante". Ha habido muchos ejemplos de inactivación génica postranscripcional y metilación del transgén (Hobbs y cols. 1990; Ingelbrecht y cols. 1994) y también se ha encontrado que la metilación del transgén está asociada en algunos casos de resistencia viral extrema (Smith y cols. 1994, English 1996). En el modelo propuesto, la metilación del transgén conduce a la producción de ARN aberrantes que inducen el sistema de vigilancia de ARN citoplásmico. Baulcombe y English han sugerido que este método de inducción puede ser el mismo que el encontrado para la inactivación de *met2* en *A. immersus*. En este sistema, la transcripción del ARN de *met2* se terminaba en las regiones metiladas del gen endógeno produciendo así ARN truncados aberrantes. Se sugirió que la metilación era una consecuencia de la interacción ectópica entre el transgén y una región homóloga de una región correspondiente del gen endógeno (Barry y cols. 1993). La presencia de múltiples transgenes crearía una probabilidad incrementada de apareamiento ectópico y por lo tanto está de acuerdo con la correlación entre el alto número de copias y la resistencia viral extrema (Mueller y cols., 1995; Goodwin y cols. 1996; Pang y cols., 1996).

Toda esta área se ha revisado recientemente (p. ej. Baulcombe (1996) y Stam y cols. (1997)) y se presentaron varios modelos. Todos los modelos prevén un alto grado de especificidad de secuencia debido a que la resistencia es muy específica (de la cepa) y por lo tanto apelan a una interacción por apareamiento de bases con un ARN producido a partir del transgén. Una explicación para la inducción de la resistencia al virus o la inactivación génica con transgenes de sentido es que la ARN polimerasa dependiente del ARN de la planta genera ARN complementarios usando el ARNm transgénico como una plantilla (Schiebel y cols. 1993a,b). Este ARN complementario (ARNc) hipotético no se ha detectado (Baulcombe 1996) pero se espera que los ARNc sean ARN pequeños y heterodispersos en vez de complementos completos (Schiebel 1993ab, Baulcombe 1996) y por lo tanto difíciles de detectar.

Los posibles métodos de acción del ARNc al mediar en la resistencia a virus o la inactivación génica (según se propone por Baulcombe, 1996) son:

1: El ARNc se hibrida con ARNm transgénico o ARN viral y el dúplex se convierte en una diana para dsRNAsas.

2: El ARNc se hibrida con ARN diana para formar un dúplex que puede detener la traducción y por consiguiente tener un efecto indirecto sobre la estabilidad (Green, 1993).

5 3: El dúplex formado entre el ARNc y el ARN viral provoca la detención de la traducción por el híbrido de cofactores requeridos para la replicación viral.

4. La hibridación de los ARNc afecta al apareamiento de bases intramolecular requerido para la replicación viral.

10 Los modelos actuales para resistencia a virus o inactivación génica implican así la inducción de un sistema de vigilancia citoplásmico bien mediante altos niveles de transcripción transgénica o bien mediante la producción de ARNm aberrante de una sola hebra. Una vez que el sistema se activa, ARN polimerasa dependiente de ARN elabora ARNc a partir del ARNm transgénico. Estos ARNc se hibridan al ARN diana bien directamente afectando a su traducibilidad o estabilidad, o bien marcando el ARN para la degradación.

15 Los documentos US 5.190.131 y EP 0 467 349 A1 describen métodos y medios para regular o inhibir la expresión génica en una célula al incorporar o asociarse con el material genético de la célula una secuencia de ácido nucleico no natural que se transcribe para producir un ARNm que es complementario a y capaz de unirse al ARNm producido por el material genético de esa célula.

20 El documento EP 0 223 399 A1 describe métodos para efectuar cambios somáticos útiles en plantas al provocar la transcripción en las células vegetales de hebras de ARN negativas que son sustancialmente complementarias a una hebra de ARN diana. La hebra de ARN diana puede ser un transcrito de ARNm creado en la expresión génica, un ARN viral u otro ARN presente en las células vegetales. La hebra de ARN negativa es complementaria a al menos una porción de la hebra de ARN diana para inhibir su actividad in vivo.

25 El documento EP 0 240 208 describe un método para regular la expresión de genes codificados en genomas de células vegetales, alcanzado mediante la integración de un gen bajo el control transcripcional de un promotor que es funcional en el hospedador y en el que la hebra transcrita de ADN es complementaria a la hebra de ADN que se transcribe del gen o los genes endógenos que se quieren regular.

30 El documento EP 0 647 715 A1 y las patentes de EE. UU. 5.034.323, 5.231.020 y 5.283.184 describen métodos y medios para producir plantas que exhiben rasgos fenotípicos deseados, al seleccionar transgenotes que comprenden un segmento de ADN enlazado operativamente a un promotor, en donde los productos de transcripción del segmento son sustancialmente homólogos a transcritos correspondientes de genes endógenos, particularmente genes endógenos de la ruta biosintética de los flavonoides.

35 El documento WO 93/23551 describe métodos y medios para la inhibición de dos o más genes diana, que comprenden introducir en la planta un solo gen de control que tiene distintas regiones de ADN homólogas a cada uno de los genes diana y un promotor operativo en plantas adaptado para transcribir desde tales regiones distintas ARN que inhibe la expresión de cada uno de los genes diana.

40 El documento WO92/13070 describe un método para la regulación de la traducción de ácidos nucleicos, que presenta una molécula de ARN sensible que codifica un polipéptido e incluye además un dominio regulador, una región de sustrato y una secuencia de reconocimiento del ribosoma. Esta molécula de ARN sensible tiene una región inhibidora en el dominio regulador, dominio regulador que es complementario tanto a la región de sustrato de la molécula de ARN sensible como a una región antiinhibidora de un ácido nucleico de señal de modo que, en ausencia del ácido nucleico de señal, las regiones inhibidora y de sustrato forman un dominio con bases apareadas cuya formación reducía el nivel de traducción de una de las regiones codificantes de proteína en la molécula de ARN sensible en comparación con el nivel de traducción de una región codificante de proteína observado en presencia del ácido nucleico de señal.

50 Metzlaff y cols., 1997 describen un modelo para la degradación de ARN mediada por ARN y la inactivación de calcona sintasa A en *Petunia*, que implica ciclos de apareamiento de ARN-ARN entre secuencias complementarias seguidos por escisiones de ARN endonucleolíticas para describir cómo es probable que se promueva la degradación de ARN.

55 Fire y cols., 1998 describen una interferencia génica específica mediante la introducción experimental de ARN de doble hebra en *Caenorhabditis elegans*. Se analiza la importancia de estos hallazgos para la genómica funcional (Wagner y Sun, 1998).

Que y cols., 1998 describen distintos patrones de supresión de pigmentos que se producen por transgenes de calcona sintasa de sentido y antisentido alélicos en flores de petunia y también han analizado los patrones de color de las flores en plantas heterocigóticas para alelos de calcona sintasa de sentido y antisentido.

5 El documento WO 98/05770 divulga ARN antisentido con estructuras secundarias especiales que se pueden usar para inhibir la expresión génica.

El documento WO 94/18337 divulga plantas transformadas que tienen ácidos linolénicos incrementados o disminuidos así como plantas que expresan una ácido linoleico desaturasa.

10 El documento US 5.850.026 divulga un aceite endógeno procedente de semillas de Brassica que contiene, después de la trituración y la extracción, más de 86% de ácido oleico y menos de 2,5% de ácido  $\alpha$ -linolénico. El aceite también contiene menos de 7% de ácido linoleico. Las semillas de Brassica son producidas por plantas que contienen inhibición específica para las semillas de la expresión de los genes de oleato desaturasa microsómica y linoleato desaturasa microsómica, en donde la inhibición se puede crear mediante tecnología de cosupresión o antisentido.

15 El documento US 5.638.637 divulga aceite vegetal de semillas de colza y colza que produce el mismo, teniendo el aceite vegetal un contenido de ácido oleico inusualmente alto de 80% a 90% en peso basado en el contenido total de ácidos grasos.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, que se puede expresar en una célula vegetal, particularmente para reducir la expresión fenotípica de un gen, particularmente un gen endógeno o un transgén extraño, integrado en el genoma de una célula vegetal o para  
 25 reducir la expresión fenotípica del ácido nucleico de interés que está comprendido en el genoma de un virus infeccioso, que comprende la etapa de introducir, preferiblemente integrar, en el genoma nuclear de la célula vegetal, un ADN quimérico que comprende un promotor, capaz de ser expresado en la célula vegetal, y opcionalmente una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación y entre medias una región de ADN, que, cuando se transcribe, da una molécula de ARN con una secuencia nucleotídica que  
 30 comprende una secuencia nucleotídica de sentido de al menos 20 nucleótidos consecutivos, particularmente al menos aproximadamente 550 nucleótidos consecutivos, que tiene 100% de identidad de secuencia con al menos parte de una región codificante del ácido nucleico de interés, y una secuencia nucleotídica antisentido que incluye al menos 20 nucleótidos consecutivos, que tiene 100% de identidad de secuencia con el tramo de 20 nucleótidos del  
 35 complemento de la secuencia nucleotídica de sentido, en donde el ARN es capaz de formar una estructura de ARN de horquilla artificial con un tallo de ARN de doble hebra mediante apareamiento de bases entre las regiones con secuencia nucleotídica de sentido y antisentido de modo que al menos los 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de sentido se apareen por bases con los 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido, dando como resultado una estructura de horquilla artificial en la que el ADN quimérico comprende uno o más intrones en la  
 40 región de ADN que cuando se transcribe da la molécula de ARN. Preferiblemente, el ADN quimérico está integrado establemente en el genoma del ADN.

La invención también proporciona una célula vegetal, que comprende un ácido nucleico de interés que normalmente es capaz de ser expresado fenotípicamente, que comprende además una molécula de ADN quimérico que  
 45 comprende un promotor, capaz de ser expresado en esa célula vegetal, una región de ADN que, cuando se transcribe, da una molécula de ARN con una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica de sentido de al menos 20 nucleótidos consecutivos que tiene 100% de identidad de secuencia con al menos parte de la secuencia nucleotídica del ácido nucleico de interés y una secuencia nucleotídica antisentido que incluye al  
 50 menos 20 nucleótidos consecutivos, que tiene 100% de identidad de secuencia con el complemento de los al menos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia nucleotídica de sentido, en donde la molécula de ARN es capaz de formar una región de ARN de doble hebra mediante apareamiento de bases entre las regiones con secuencia  
 55 nucleotídica de sentido y antisentido de modo que al menos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de sentido se apareen por bases con dichos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido, dando como resultado una estructura de ARN de horquilla, preferiblemente una estructura de horquilla artificial, y una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación, en donde la expresión fenotípica del ácido  
 nucleico de interés se reduce significativamente y en donde el gen quimérico comprende uno o más intrones en la  
 60 región de ADN que, cuando se transcribe, da la molécula de ARN.

Con los objetivos, las ventajas y las características de la invención precedentes y otros que se harán evidentes más adelante, la naturaleza de la invención se puede entender más claramente con referencia a la siguiente descripción  
 detallada de las realizaciones de la invención y a las reivindicaciones adjuntas.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa esquemáticamente las diferentes construcciones de sentido y antisentido, así como las llamadas construcciones de CoP (par complementario) usadas para obtener resistencia a virus (Fig 1B) o para reducir la expresión fenotípica de un gen Gus transgénico (Fig 1A).

- 5 La Figura 2A representa esquemáticamente la llamada construcción de mango de sartén o construcciones de CoP usadas para reducir la expresión fenotípica de un gen de  $\Delta 12$  desaturasa en Arabidopsis (Pro Nos: promotor del gen de nopalina sintasa; nptII región codificante de neomicina fosfotransferasa; Term Nos: terminador del gen de nopalina sintasa; FP1: promotor de napina específico de semillas truncado; 480 pb: extremo 5' del gen Fad2 de Arabidopsis thaliana en la orientación de sentido; 623 pb: espaciador; 480 pb: extremo 5' del gen Fad2 de Arabidopsis thaliana en la orientación antisentido.

La Figura 2B representa esquemáticamente una construcción de cosupresión común para reducir la expresión fenotípica de un gen de  $\Delta 12$  desaturasa en Arabidopsis thaliana.

### Descripción detallada

15 Se describe en la presente una célula vegetal con una molécula de ARN que comprende una estructura de horquilla que incluye una parte de sentido determinada y una parte antisentido determinada. Potencialmente, una molécula de ARN es capaz de formar varias estructuras secundarias, algunas de las cuales pueden contener la horquilla deseada. Se espera que la estructura secundaria real del ARN en la célula tenga la energía libre más baja. Según la invención, la molécula de ARN que se va a producir en la célula está diseñada de tal modo que al menos en su estado de energía libre más baja, que puede asumir dentro de esa célula, comprenda la horquilla deseada.

20 Según se usa en la presente, "ARN de horquilla" se refiere a cualquier molécula de ARN de doble hebra autorrenaturalizante. En su representación más simple, un ARN de horquilla consiste en un tallo de doble hebra constituido por las hebras de ARN renaturalizantes, conectado por un bucle de ARN de una sola hebra, y también se denomina "ARN de mango de sartén". Sin embargo, el término "ARN de horquilla" también está destinado a abarcar estructuras de ARN secundarias más complicadas que comprenden secuencias de ARN de doble hebra autorrenaturalizantes, pero también protuberancias y bucles internos. La estructura secundaria específica adaptada estará determinada por la energía libre de la molécula de ARN, y se puede predecir para diferentes situaciones usando un software apropiado tal como FOLDRNA (Zuker y Stiegler, 1981).

30 Según se usa en la presente, "identidad de secuencia" con respecto a secuencias nucleotídicas (ADN o ARN) se refiere al número de posiciones con nucleótidos idénticos dividido por el número de nucleótidos en la más corta de las dos secuencias. El alineamiento de las dos secuencias nucleotídicas se realiza mediante el algoritmo de Wilbur y Lipmann (Wilbur y Lipmann, 1983) usando un tamaño de intervalo de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos y una penalización por hueco de 4. El análisis y la interpretación asistidos por ordenador de los datos de las secuencias, incluyendo el alineamiento de secuencias como se describe anteriormente, se pueden realizar convenientemente, p. ej., usando los programas de Intelligenetics™ Suite (Intelligenetics Inc., CA). Las secuencias se indican como "esencialmente similares" cuando tal secuencia tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 75%, particularmente al menos aproximadamente 80%, más particularmente al menos aproximadamente 85%, bastante particularmente aproximadamente 90%, especialmente aproximadamente 95%, más especialmente aproximadamente 100%, bastante especialmente son idénticas. Esta claro que cuando se dice que las secuencias de ARN son esencialmente similares o tienen un cierto grado de identidad de secuencia con secuencias de ADN, la timina (T) en la secuencia de ADN se considera igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN.

45 Según se usa en la presente, el término "promotor expresable por plantas" significa una secuencia de ADN que es capaz de controlar (iniciar) la transcripción en una célula vegetal. Esto incluye cualquier promotor de origen vegetal, pero también cualquier promotor de origen no vegetal que sea capaz de dirigir la transcripción en una célula vegetal, es decir, ciertos promotores de origen viral o bacteriano tales como el CaMV35S, el promotor del virus del trébol subterráneo No 4 o No 7, o promotores del gen de T-ADN.

50 El término "expresión de un gen" se refiere al proceso en el que una región de ADN que está enlazada operativamente a regiones reguladoras apropiadas, particularmente a un promotor, se transcribe en un ARN que es biológicamente activo, es decir, que bien es capaz de interacción con otro ácido nucleico o bien que es capaz de ser traducido en un polipéptido o una proteína. Se dice que un gen codifica un ARN cuando el producto final de la expresión del gen es ARN biológicamente activo, tal como, p. ej., un ARN antisentido, una ribozima o un producto intermedio replicativo. Se dice que un gen codifica una proteína cuando el producto final de la expresión del gen es una proteína o un polipéptido.

Un ácido nucleico de interés es "capaz de ser expresado" cuando dicho ácido nucleico, cuando se introduce en una célula hospedadora adecuada, particularmente en una célula vegetal, se puede transcribir (o replicar) para dar un ARN, y/o traducir para dar un polipéptido o una proteína en esa célula hospedadora.

5 El término "gen" significa cualquier fragmento de ADN que comprenda una región de ADN (la "región de ADN transcrita") que se transcriba en una molécula de ARN (p. ej., un ARNm) en una célula enlazada operativamente a regiones reguladoras adecuadas, p. ej., un promotor expresable en plantas. Un gen puede comprender así varios fragmentos de ADN enlazados operativamente tales como un promotor, una secuencia líder 5', una región codificante y una región 3' que comprende un sitio de poliadenilación. Un gen vegetal endógeno para una especie vegetal particular (gen vegetal endógeno) es un gen que se encuentra naturalmente en esa especie vegetal o que se puede introducir en esa especie vegetal mediante cruce convencional. Un gen quimérico es cualquier gen que no se encuentre normalmente en una especie vegetal o, alternativamente, cualquier gen en el que el promotor no esté asociado en la naturaleza con parte o la totalidad de la región de ADN transcrita o con al menos otra región reguladora del gen.

15 Según se usa en la presente, "expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés" se refiere a cualquier rasgo cuantitativo asociado con la expresión molecular de un ácido nucleico en una célula hospedadora y así puede incluir la cantidad de moléculas de ARN transcritas o replicadas, la cantidad de moléculas de ARN modificadas postranscripcionalmente, la cantidad de péptidos o proteínas traducidos, la actividad de tales péptidos o proteínas.

20 Un "rasgo fenotípico" asociado con la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés se refiere a cualquier rasgo cuantitativo o cualitativo, incluyendo el rasgo mencionado, así como el efecto directo o indirecto mediado sobre la célula, o el organismo que contiene esa célula, mediante la presencia de las moléculas de ARN, el péptido o la proteína, o el péptido o la proteína modificados postraduccionalmente. La mera presencia de un ácido nucleico en una célula hospedadora no se considera una expresión fenotípica o un rasgo fenotípico de ese ácido nucleico, aunque se pueda seguir cuantitativamente o cualitativamente. Ejemplos de efectos directos o indirectos mediados en células u organismos son, p. ej., rasgos agrónomamente o industrialmente útiles, tales como resistencia a una plaga o enfermedad; contenido de aceite superior o modificado, etc.

25 Según se usa en la presente, "reducción de la expresión fenotípica" se refiere a la comparación de la expresión fenotípica del ácido nucleico de interés para la célula vegetal en presencia del ARN o los genes quiméricos descritos en la presente con la expresión fenotípica del ácido nucleico de interés en ausencia del ARN o los genes quiméricos que se describen en la presente. La expresión fenotípica en presencia del ARN quimérico debe ser así inferior que la expresión fenotípica en ausencia del mismo, preferiblemente ser sólo aproximadamente 25%, particularmente sólo aproximadamente 10%, más particularmente sólo aproximadamente 5% de la expresión fenotípica en ausencia del ARN quimérico, especialmente la expresión fenotípica debe ser completamente inhibida para todos los propósitos prácticos por la presencia del ARN quimérico o el gen quimérico que codifica tal ARN.

30 Una reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico donde el fenotipo es un rasgo cualitativo significa que en presencia del ARN o el gen quimérico de la invención, el rasgo fenotípico cambia hasta un estado discreto diferente cuando se compara con una situación en la que tal ARN o gen está ausente. Una reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico se puede medir así, entre otras cosas, como una reducción en la transcripción de (parte de) ese ácido nucleico, una reducción en la traducción de (parte de) ese ácido nucleico o una reducción en el efecto que tiene la presencia del ARN o los ARN transcritos o el polipéptido o los polipéptidos traducidos sobre la célula vegetal o la planta, y finalmente conducirá a rasgos fenotípicos alterados. Esta claro que la reducción en la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés se puede efectuar mediante o correlacionarse con un incremento en un rasgo fenotípico.

35 Según se usa en la presente, "un ácido nucleico de interés" o un "ácido nucleico diana" se refiere a cualquier molécula de ARN o secuencia de ADN particular que pueda estar presente en una célula vegetal.

40 Según se usa en la presente, "que comprende" se debe interpretar como especificar la presencia de las características, los números enteros, las etapas o los componentes indicados que se mencionen, pero no excluye la presencia o la adición de uno o más de las características, los números enteros, las etapas o los componentes, o grupos de los mismos. Así, p. ej., un ácido nucleico o una proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los citados realmente, es decir, estar incrustado en un ácido nucleico o una proteína mayor. Un gen quimérico que comprende una región de ADN que está funcionalmente o estructuralmente definido puede comprender regiones de ADN adicionales, etc.

45 Se ha encontrado inesperadamente por los inventores que la introducción de un gen quimérico capaz de ser transcrito a una molécula de ARN con una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia nucleotídica tanto de sentido como antisentido de un gen diana, o una parte de la misma, integrada en el genoma nuclear de una célula vegetal, podría reducir eficazmente y específicamente la expresión fenotípica de ese gen diana. La reducción en la expresión fenotípica era más eficaz y más predecible que la observada cuando se introducían genes quiméricos separados en células similares con el gen diana, que codifica moléculas de ARN bien de sentido o bien antisentido.

Al mismo tiempo, también se ha observado que la introducción simultánea de genes quiméricos separados en una célula que codifica moléculas de ARN con secuencias nucleotídicas que comprenden sentido y antisentido, respectivamente, daba como resultado una resistencia al virus extrema, aunque los genes quiméricos se transcribieran desde promotores más débiles. Se sabe bien que la inactivación génica y la resistencia al virus pueden estar mediadas por fenómenos similares.

Se divulga en la presente un método para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, que normalmente es capaz de expresarse en una célula vegetal, que comprende las etapas de introducir un ADN quimérico que comprender las siguientes partes enlazadas operativamente:

a) un promotor, operativo en esa célula, particularmente un promotor expresable en plantas;

b) una región de ADN capaz de ser transcrita en una molécula de ARN con una secuencia nucleotídica que comprende

i. una secuencia nucleotídica de sentido de al menos 10 nt, preferiblemente 15 nucleótidos consecutivos, que tiene entre 75 y 100% de identidad de secuencia con al menos parte de la secuencia nucleotídica del ácido nucleico de interés; y

ii. una secuencia nucleotídica antisentido que incluye al menos 10, preferiblemente 15 nucleótidos consecutivos, que tiene entre aproximadamente 75% y aproximadamente 100% de identidad de secuencia con el complemento de los al menos 10, preferiblemente 15 nucleótidos consecutivos, de la secuencia nucleotídica de sentido;

en donde el ARN es capaz de formar un ARN de doble hebra mediante apareamiento de bases entre las regiones con secuencia nucleotídica de sentido y antisentido dando como resultado una estructura de ARN de horquilla; y

c) una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación que funciona en las células eucarióticas adecuadas, funcionando particularmente en células vegetales.

En una realización preferida de la divulgación, la molécula de ARN transcrita desde el gen quimérico consiste esencialmente en el ARN de horquilla.

Se cree que el orden de la secuencia nucleotídica de sentido y antisentido en la molécula de ARN no es crítico.

Así, en otras palabras, el ADN quimérico tiene una región de ADN transcrita que, cuando se transcribe, da una molécula de ARN que comprende una región de ARN capaz de formar una estructura de tallo-bucle artificial, en donde una de las secuencias de ARN renaturalizantes de la estructura de tallo-bucle comprende una secuencia, esencialmente similar a al menos parte de la secuencia nucleotídica del ácido nucleico de interés, y en donde la segunda de las secuencias de ARN renaturalizantes comprende una secuencia esencialmente similar a al menos parte del complemento de al menos parte de la secuencia nucleotídica del ácido nucleico de interés.

La molécula de ARN puede comprender varias estructuras de horquilla artificiales, que pueden estar diseñadas para reducir la expresión fenotípica de diferentes ácidos nucleicos de interés.

En una realización preferida, el ácido nucleico de interés, cuya expresión fenotípica es elegida para ser reducida, es un gen incorporado en el genoma de una célula vegetal. Se apreciará que los medios y los métodos de la invención se pueden usar para la reducción de la expresión fenotípica de un gen que pertenece al genoma de la célula según está presente en la naturaleza, (un gen endógeno), así como para la reducción de la expresión fenotípica de un gen que no pertenece al genoma de la célula según está presente en la naturaleza, pero se ha introducido en esa célula (un transgén). El transgén se puede introducir establemente o transitoriamente, y se puede integrar en el genoma nuclear de la célula, o estar presente sobre un vector de replicación, tal como un vector viral.

En otra realización preferida, el ácido nucleico de interés, cuya expresión fenotípica es elegida para ser reducida, es un ácido nucleico viral, particularmente una molécula de ARN viral, capaz de infectar una célula eucariótica, particularmente una célula vegetal. En este caso, el fenotipo que se va a reducir es la replicación del virus, y finalmente los síntomas de la enfermedad provocados por el virus infeccioso.

Preferiblemente, la secuencia nucleotídica del ácido nucleico diana que corresponde a la secuencia nucleotídica de sentido es parte de una región de ADN que se transcribe, particularmente una región de ADN que se transcribe y se traduce (en otras palabras, una región codificante). Se prefiere particularmente que la secuencia diana corresponda

a uno o más exones consecutivos, más particularmente está situada dentro de un solo exón de una región codificante.

La longitud de la secuencia nucleotídica de sentido puede variar de aproximadamente 20 nucleótidos (nt) hasta una longitud que iguale la longitud (en nucleótidos) del ácido nucleico diana. Preferiblemente, la longitud total de la secuencia nucleotídica de sentido es al menos aproximadamente 50 nt, más particularmente al menos aproximadamente 100 nt, especialmente al menos aproximadamente 150 nt, más especialmente al menos aproximadamente 200 nt, bastante especialmente al menos aproximadamente 550 nt. Se espera que no haya límite superior para la longitud total de la secuencia nucleotídica de sentido, aparte de la longitud total del ácido nucleico diana. Sin embargo, por razones prácticas (tales como, p. ej., la estabilidad de los genes quiméricos) se espera que la longitud de la secuencia nucleotídica de sentido no supere 5.000 nt, particularmente no supere 2.500 nt y debe estar limitada a aproximadamente 1.000 nt.

Se apreciará que cuanto mayor sea la longitud total de la secuencia nucleotídica de sentido, menos rigurosos se hacen los requisitos para la identidad de secuencia entre la secuencia nucleotídica de sentido total y la correspondiente secuencia en el gen diana. Preferiblemente, la secuencia nucleotídica de sentido total debe tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 75% con la correspondiente secuencia diana, particularmente al menos aproximadamente 80%, más particularmente al menos aproximadamente 85%, bastante particularmente aproximadamente 90%, especialmente aproximadamente 95%, más especialmente aproximadamente 100%, bastante especialmente ser idéntica a la parte correspondiente del ácido nucleico diana. Sin embargo, se prefiere que la secuencia nucleotídica de sentido incluya siempre una secuencia de aproximadamente 20 nt, más particularmente aproximadamente 50 nt, especialmente aproximadamente 100 nt, bastante especialmente aproximadamente 150 nt con 100% de identidad de secuencia con la parte correspondiente del ácido nucleico diana. Preferiblemente, para calcular la identidad de secuencia y diseñar la secuencia diana correspondiente, el número de huecos se debe minimizar, particularmente para las secuencias de sentido más cortas.

La longitud de la secuencia nucleotídica antisentido está en gran parte determinada por la longitud de la secuencia nucleotídica de sentido, y preferiblemente corresponderá a la longitud de la última secuencia. Sin embargo, es posible usar una secuencia antisentido que difiera en longitud en aproximadamente 10%. De forma similar, la secuencia nucleotídica de la región antisentido está en gran parte determinada por la secuencia nucleotídica de la región de sentido, y preferiblemente es idéntica al complemento de la secuencia nucleotídica de la región de sentido. Particularmente con las regiones antisentido más largas, sin embargo es posible usar secuencias antisentido con menor identidad de secuencia para el complemento de la secuencia nucleotídica de sentido, preferiblemente con al menos aproximadamente 75% de identidad de secuencia, más preferiblemente con al menos aproximadamente 80%, particularmente con al menos aproximadamente 85%, más particularmente con al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, especialmente con al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con el complemento de la secuencia nucleotídica de sentido. No obstante, se prefiere que las secuencias nucleotídicas antisentido siempre incluyan una secuencia de aproximadamente 20 nt, más particularmente aproximadamente 50 nt, especialmente aproximadamente 100 nt, bastante especialmente aproximadamente 150 nt con 100% de identidad de secuencia con el complemento de una parte correspondiente de la secuencia nucleotídica de sentido. Está claro que la longitud del tramo de los nucleótidos consecutivos con 100% de identidad de secuencia con el complemento de la secuencia nucleotídica de sentido no puede ser mayor que la propia secuencia nucleotídica de sentido. De nuevo, preferiblemente, el número de huecos se debe minimizar, particularmente para las secuencias antisentido más cortas. Además, también se prefiere que la secuencia antisentido tenga entre aproximadamente 75% y 100% de identidad de secuencia con el complemento de la secuencia diana.

La molécula de ARN que resulta de la transcripción del ADN quimérico puede comprender una secuencia nucleotídica espaciadora situada entre las secuencias nucleotídicas de sentido y antisentido. En ausencia de tal secuencia espaciadora, la molécula de ARN todavía será capaz de formar un ARN de doble hebra, particularmente si la secuencia nucleotídica de sentido y antisentido son mayores de aproximadamente 10 nucleótidos y parte de la secuencia nucleotídica de sentido y/o antisentido se usa para formar el bucle que permita el apareamiento de bases entre las regiones con secuencia nucleotídica de sentido y antisentido y la formación de un ARN de doble hebra. Se espera que no haya límites de longitud o requisitos de secuencia asociados con la región espaciadora, con tal de que estos parámetros no interfieran con la capacidad de las regiones de ARN con la secuencia nucleotídica de sentido y antisentido para formar un ARN de doble hebra. En una realización preferida, la región espaciadora varía en longitud de 4 a aproximadamente 200 pb, pero, como se mencionó previamente, puede estar ausente.

En una realización preferida, el ARN de horquilla formado por la región de sentido y antisentido y si es apropiado la región espaciadora es un ARN de horquilla artificial. Por "ARN de horquilla artificial" o "estructura de ARN de tallo-horquilla artificial" se entiende que tal ARN de horquilla no está presente en la naturaleza, debido a que las regiones de sentido y antisentido que se definen no están presentes en la naturaleza simultáneamente en una molécula de ARN, o las regiones de sentido y antisentido están separadas por una región espaciadora que es heteróloga con respecto al gen diana, particularmente, la secuencia nucleotídica del espaciador tiene una identidad de secuencia de menos de 75% con la secuencia nucleotídica de la secuencia diana, en la posición 5' o 3' correspondiente de los puntos finales de la secuencia nucleotídica de sentido. Un ARN de horquilla también se puede indicar como artificial

si no está comprendido dentro de la molécula de ARN con la que está normalmente asociado. Es concebible usar según la invención un ADN quimérico cuya transcripción dé como resultado una estructura de ARN de horquilla con una secuencia nucleotídica presente en la naturaleza (que por lo demás cumple los límites que se indican en esta memoria descriptiva) con la condición de que este ARN de horquilla carezca de las secuencias de ARN circundantes (no implicadas en la formación de la estructura de horquilla).

Aunque se prefiere que la molécula de ARN que comprende el ARN de horquilla no comprenda además una secuencia intrónica, está claro que los genes de ADN quiméricos que codifican tales ARN pueden comprender en su región transcrita uno o más intrones.

De hecho, los inventores han encontrado inesperadamente que la inclusión de una secuencia intrónica en los genes de ADN quiméricos que codifican una molécula de ARN que comprende el ARN de horquilla, preferiblemente en la región espaciadora, y preferiblemente en orientación de sentido, potencia la eficacia de la reducción de la expresión del ácido nucleico diana. La potenciación en la eficacia se puede expresar como un incremento en la frecuencia de plantas en las que se produce inactivación o como un incremento en el nivel de reducción del rasgo fenotípico. En una realización particularmente preferida, el intrón es esencialmente idéntico en secuencia al intrón 2 de piruvato ortofosfato dicinasa 2 de *Flaveria trinervia*, más particularmente, comprende la secuencia de SEQ ID N° 7.

Se ha observado que contrariamente a los métodos que usan secuencias nucleotídicas bien antisentido o bien de sentido solas para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico diana (que generalmente depende de la dosificación de la molécula de sentido o antisentido, y así los genes quiméricos que codifican las moléculas de sentido y antisentido necesitan estar bajo el control de promotores relativamente fuertes), el método divulgado en la presente no confía en la presencia de tales regiones promotoras fuertes para conducir la producción transcripcional del ARN que comprende la región tanto de sentido con antisentido. En otras palabras, una gama entera de promotores, particularmente promotores expresables en plantas, está disponible para dirigir la transcripción de los genes quiméricos de la invención. Estos incluye, pero no se limitan a, promotores fuertes tales como promotores CaMV35S (p. ej., Harpster y cols., 1988). A la luz de la existencia de formas variantes del promotor CaMV35S, como es sabido por los expertos, el objetivo de la invención se puede alcanzar igualmente al emplear estos promotores de CaMV35S alternativos y variantes. También está claro que otros promotores expresables en plantas, particularmente promotores constitutivos, tales como los promotores de opina sintasa de los plásmidos Ti o Ri de *Agrobacterium*, particularmente un promotor de nopalina sintasa, o promotores del virus del trébol subterráneo, se podrían usar para obtener efectos similares. También se contemplan por la invención genes quiméricos para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico en una célula, que están bajo el control de promotores específicos de ARN polimerasa del bacteriófago de una sola unidad, tales como un promotor específico de T7 o T3, con la condición de que las células hospedadoras también comprendan la ARN polimerasa correspondiente en una forma activa.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar métodos para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico en células vegetales específicas al poner los genes quiméricos de la invención bajo el control de promotores específicos de tejidos o específicos de órganos. Tales promotores específicos de tejidos o específicos de órganos son muy conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, promotores específicos de semillas (p. ej., documento WO89/03887), promotores específicos de primordios de órganos (An y cols., 1996), promotores específicos del tallo (Keller y cols., 1988), promotores específicos de las hojas (Hudspeth y cols., 1989), promotores específicos del mesófilo (tales como los promotores de Rubisco inducibles por luz), promotores específicos de las raíces (Keller y cols., 1989), promotores específicos de tubérculos (Keil y cols., 1989), promotores específicos del tejido vascular (Peleman y cols., 1989), promotores selectivos de los estambres (documentos WO 89/10396, WO 92/13956), promotores específicos de la zona de dehiscencia (documento WO 97/13865) y similares.

En otra realización de la invención, la expresión de un gen quimérico para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico diana puede ser controlada a voluntad mediante la aplicación de un inductor químico apropiado, al enlazar operativamente la región de ADN transcrita de los genes quiméricos de la invención a un promotor cuya expresión es inducida por un compuesto químico, tal como el promotor del gen divulgado en la Publicación de Patente Europea ("EP") 0332104, o el promotor del gen divulgado en el documento WO 90/08826.

El gen o los genes quiméricos para la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico diana de interés en una célula bien se pueden introducir transitoriamente o bien se pueden integrar establemente en el genoma nuclear de la célula. En una realización, el gen quimérico se sitúa en un vector viral, que es capaz de replicarse en la célula vegetal (véanse, p. ej., los documentos WO 95/34668 y WO 93/03161).

El ADN recombinante que comprende el gen quimérico para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés en una célula hospedadora puede estar acompañado por un gen marcador quimérico, particularmente cuando se prevé la integración estable del transgén en el genoma de la célula hospedadora. El gen marcador quimérico puede comprender un ADN marcador que está enlazado operativamente en su extremo 5' a un promotor, que funciona en la célula hospedadora de interés, particularmente un promotor expresable en plantas, preferiblemente un promotor constitutivo, tal como el promotor CaMV 35S, o un promotor inducible por luz tal como el promotor del gen que codifica la subunidad pequeña de Rubisco; y enlazado operativamente en su extremo 3' a señales de formación y poliadenilación del extremo 3' por transcripción de plantas adecuadas. Se espera que la

elección del ADN marcador no sea crítica, y se puede usar cualquier ADN marcador adecuado. Por ejemplo, un ADN marcador puede codificar una proteína que proporcione un color distinguible a la célula vegetal transformada, tal como el gen A1 (Meyer y cols., 1987), puede proporcionar resistencia a herbicidas a la célula vegetal transformada, tal como el gen *bar*, que codifica la resistencia a fosfinotricina (documento EP 0.242.246), puede proporcionar resistencia a antibióticos a las células transformadas, tal como el gen *aac(6)*, que codifica la resistencia a gentamicina (documento WO94/01560).

Un ADN recombinante que comprende un gen quimérico para reducir la expresión fenotípica de un gen de interés se puede incorporar establemente en el genoma nuclear de una célula de una planta. La transferencia génica se puede llevar a cabo con un vector que es un plásmido Ti desarmado, que comprende un gen quimérico de la invención, y soportado por *Agrobacterium*. Esta transformación se puede llevar a cabo usando los procedimientos descritos, por ejemplo, en el documento EP 0 116 718.

Alternativamente, se puede usar cualquier tipo de vector para transformar la célula vegetal, aplicando métodos tales como transferencia génica directa (según se describe, por ejemplo, en el documento EP 0 233 247), transformación mediada por polen (según se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0 270 356, WO85/01856 y US 4,684,611), transformación mediada por virus de ARN de planta (según se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0 067 553 y US 4.407.956), transformación mediada por liposomas (según se describe, por ejemplo, en el documento US 4.536.475), y similares.

También son adecuados otros métodos, tales como bombardeo con microproyectiles según se describe para el maíz por Fromm y cols. (1990) y Gordon-Kamm y cols. (1990). Células de plantas monocotiledóneas, tales como los principales cereales, también se pueden transformar usando tejido embrionario compacto herido y/o degradado con enzimas capaz de formar callo embriogénico compacto, o embriones inmaduros heridos y/o degradados según se describe en el documento WO92/09696. La célula vegetal transformada resultante se puede usar a continuación para regenerar una planta transformada de un modo convencional.

La planta transformada obtenida se puede usar en un esquema de cruce convencional para producir más plantas transformadas con las mismas características o para introducir el gen quimérico para la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés de la invención en otras variedades de la misma especie de planta o una relacionada, o en plantas híbridas. Las semillas obtenidas de las plantas transformadas contienen los genes quiméricos de la invención como una inserción genómica estable.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar células vegetales y plantas que comprenden los genes quiméricos para la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico diana según se describe en la invención.

Se apreciará que los métodos y los medios descritos en la memoria descriptiva también se pueden aplicar en métodos de cribado de alto rendimiento (HTS), para la identificación o confirmación de fenotipos asociados con la expresión de una secuencia de ácido nucleico con la función todavía no identificada en una célula vegetal.

Tal método comprende las etapas de

1. seleccionar una secuencia diana dentro de la secuencia de ácido nucleico de interés con función/fenotipo no identificados o no confirmados cuando se expresa. Preferiblemente, si el ácido nucleico tiene marcos de lectura abiertos putativos, la secuencia diana debe comprender al menos parte de uno de estos marcos de lectura abiertos. La longitud de la secuencia nucleotídica diana puede variar de aproximadamente 10 nucleótidos hasta una longitud que iguale la longitud (en nucleótidos) del ácido nucleico de interés con función no identificada.

2. diseñar una molécula de ARN que comprende una secuencia nucleotídica de sentido y una secuencia nucleotídica antisentido según la invención.

3. introducir la molécula de ARN que comprende las secuencias nucleotídicas tanto de sentido como antisentido diseñada sobre la base de la secuencia diana en una célula vegetal adecuada, que comprende el ácido nucleico con la secuencia nucleotídica con fenotipo todavía no identificado. El ARN se puede introducir por medio de un ADN quimérico que comprende un promotor operativo en la célula hospedadora de interés, particularmente un promotor expresable en plantas, y una región de ADN que funciona como una señal de formación y poliadenilación del extremo 3' (terminador) adecuada que funciona en la célula hospedadora, con una región de ADN intercalada que se puede transcribir para dar la molécula de ARN que comprende la secuencia nucleotídica de sentido y antisentido. El ADN quimérico bien se puede introducir transitoriamente o bien se puede integrar en el genoma nuclear. El ADN quimérico también se puede proporcionar en un vector viral (véanse, p. ej., los documentos WO 95/34668 y WO 93/03161)

4. observar el fenotipo mediante un método adecuado. Dependiendo del fenotipo esperado, puede ser suficiente observar o medir el fenotipo de una sola célula, pero también se puede requerir cultivar las células para obtener un nivel multicelular (organizado), o incluso para regenerar un organismo transgénico, particularmente una planta transgénica.

5 En su realización más sencilla, la molécula de ARN que comprende las secuencias nucleotídicas tanto de sentido como antisentido para al menos parte de un ácido nucleico de interés, adecuada para los métodos de la invención, se puede obtener al clonar dos copias de una región de ADN con la secuencia diana seleccionada en una orientación repetida invertida (preferiblemente separada por una región de ADN corta que no contiene una señal de terminación de la transcripción, y codifica la secuencia espaciadora) bajo un promotor adecuado. Este ADN quimérico se introduce en la célula hospedadora.

10 Los métodos y los medios descritos en la presente se pueden usar así para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico en una célula vegetal o una planta, para obtener resistencia a la rotura (documento WO 97/13865), para obtener patrones de color de las flores modificados (documentos EP 522 880, US 5.231.020), para obtener plantas resistentes a los nematodos (documentos WO 92/21757, WO 93/10251, WO 94/17194), para retrasar la maduración de los frutos (documentos WO 91/16440, WO 91/05865, WO 91/16426, WO 92/17596, WO 93/07275, WO 92/04456, US 5.545.366), para obtener androesterilidad (documentos WO 94/29465, WO89/10396, WO 92/18625), para reducir la presencia de metabolitos (secundarios) no deseados en organismos, tales como glucosinolatos (documento WO97/16559) o el contenido de clorofila (EP 779 364) en plantas, para modificar el perfil de metabolitos sintetizados en una célula u organismo eucariótico mediante ingeniería metabólica, p. ej. al reducir la expresión de genes particulares implicados en el metabolismo de los carbohidratos (documentos WO 92/11375, WO 92/11376, US 5.365.016, WO 95/07355) o la biosíntesis de lípidos (documentos WO 94/18337, US 5.530.192), para retrasar la senescencia (documento WO 95/07993), para alterar la lignificación en plantas (documentos WO 93/05159, WO 93/05160), para alterar la calidad de las fibras en el algodón (documento US 5.597.718), para incrementar la resistencia a las magulladuras en patatas al reducir la polifenoloxidasas (documento WO 94/03607), etc.

15 Los métodos de la invención conducirán a mejores resultados y/o mayores eficacias en comparación con los métodos que usan secuencias nucleotídicas de sentido o antisentido convencionales y se cree que otros mecanismos específicos de las secuencias que regulan la expresión fenotípica de ácidos nucleicos diana podrían estar implicados y/o ser activados por la presencia de las moléculas de ARN de doble hebra descritas en esta memoria descriptiva.

20 Se ha descrito una aplicación particular para la reducción de la expresión fenotípica de un transgén en una célula vegetal, entre otros, mediante métodos de sentido o antisentido, para la restauración de la androfertilidad, obteniéndose la última mediante la introducción de un transgén que comprende un ADN de androesterilidad (documentos WO 94/09143, WO 91/02069). El ácido nucleico de interés es específicamente el ADN de androesterilidad. De nuevo, los procedimientos y los productos descritos en esta invención se pueden aplicar a estos métodos a fin de llegar a una restauración más eficaz de la androfertilidad.

25 Los métodos y medios descritos en la presente, particularmente los que implican moléculas de ARN que comprenden un ARN de horquilla y los genes quiméricos codificantes, han resultado ser particularmente adecuados para la modificación de la composición del contenido de aceite en plantas, particularmente en semillas. Plantas particularmente preferidas son plantas de cultivo usadas para la producción de aceite tales como, pero no limitadas a, colza (*Brassica juncea*, *napus*, *rapa*, *oleracea*, *campestris*), maíz, algodón, cacahuete, girasol, semillas de ricino, lino, coco, linaza, soja. Genes diana preferidos son los genes de desaturasa, particularmente genes que codifican  $\Delta 12$  desaturasa tales como los codificados por los genes *Fad2*, especialmente los genes cuya secuencia nucleotídica se puede encontrar en la base de datos Genbank bajo el número de registro AF123460 (de *Brassica carinata*), AF12042841 (*Brassica rapa*), L26296 (*Arabidopsis thaliana*) o A65102 (*Corylus avellana*). Esta claro que está totalmente al alcance del experto en la técnica obtener genes homólogos a los genes *fad2* divulgados procedentes de otras especies, p. ej. mediante técnicas de hibridación y/o PCR.

30 Variantes preferidas para la configuración de secuencias nucleotídicas de sentido y antisentido, particularmente en lo relativo a la longitud y la secuencia, son como las mencionadas en otras partes de esta memoria descriptiva. Además, variantes preferidas para genes quiméricos que codifican moléculas de ARN que contienen horquillas, particularmente en lo relativo a elementos promotores, son como se describe, en otras partes de esta memoria descriptiva. Para esta solicitud, se prefiere particularmente que los promotores sean promotores específicos de células.

35 Se divulga en la presente que la molécula de ARN que comprende el ARN de horquilla comprende así parte de un ORF que codifica  $\Delta 12$  desaturasa en orientación de sentido y una parte similar en orientación antisentido, preferiblemente separadas por una secuencia espaciadora. En una variante particularmente preferida el ARN de horquilla artificial (o su gen quimérico codificante) comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID N° 6 o una secuencia nucleotídica construida de forma similar basada en los susodichos genes *fad2* de *Brassica*.

Preferiblemente, el gen quimérico que codifica el ARN de horquilla artificial se transcribe bajo el control de un promotor específico de semillas, particularmente bajo el control del promotor FPI según se describe en otras partes en esta solicitud.

5 Una reducción de la expresión del gen de  $\Delta 12$  desaturasa en plantas que contienen aceite conduce a un incremento en el ácido oleico y una disminución concomitante en el ácido linolénico y el ácido linoleico. Se encuentra una frecuencia superior de plantas con aceite en las que es significativo el incremento en ácido oleico y la disminución concomitante en el ácido linolénico y linoleico usando los medios y los métodos de la invención que en plantas transgénicas que alojan construcciones de cosupresión comunes. Por otra parte, los niveles absolutos de incremento, y respectivamente disminución, son superiores, y respectivamente inferiores, que en plantas transgénicas que alojan construcciones de cosupresión comunes.

15 Usando los medios y los métodos descritos en la presente, es así posible obtener plantas y semillas, que comprenden un aceite del cual la composición después de la trituración y la extracción tiene un contenido incrementado de ácido oleico (expresado como un porcentaje de la composición de ácidos grasos total), particularmente un incremento de tres veces, cuando se comparan con plantas de control.

20 Se espera que usando los métodos y los medios descritos en la presente, se pueda obtener una planta de Brassica transgénica, cuyas semillas comprenden un aceite en el que el contenido de ácido oleico supera el 90% del contenido de ácidos grasos total.

25 Los métodos y los medios de la invención serán especialmente adecuados para obtener resistencia a virus, particularmente resistencia a virus extrema, en células u organismos eucarióticos, particularmente en células vegetales y plantas. Una lista no limitativa de virus para plantas contra los que se puede obtener resistencia se representa en la tabla I.

30 Los métodos y los medios de la invención permiten además el uso de genes virales, hasta ahora no usados para obtener plantas resistentes a virus, además de los genes de proteína de envuelta o genes de replicasa usados comúnmente. Tales genes virales diferentes incluyen genes codificados por proteasas (Pro), genes que codifican proteína ligada al genoma (Vpg), genes que codifican cuerpos de inclusión citoplásmicos (CI) como secuencias de ácido nucleico diana para obtener plantas resistentes a virus.

35 Esta claro que la invención será especialmente adecuada para la reducción de la expresión fenotípica de genes pertenecientes a familias multigénicas.

40 También está claro que los métodos y los medios de la invención son adecuados para la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico en todas las células vegetales de todas las plantas, ya sean plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas, particularmente plantas de cultivo tales como, pero no limitadas a, maíz, arroz, trigo, cebada, caña de azúcar, algodón, colza, soja, hortalizas (incluyendo achicoria, brasicáceas, lechuga, tomate), tabaco, patata, remolacha azucarera, pero también plantas usadas en horticultura, floricultura o silvicultura. Los medios y los métodos de la invención serán particularmente adecuados para plantas que tienen genomas complejos, tales como plantas poliploides.

45 Se espera que las moléculas de ARN quiméricas producidas mediante la transcripción de los genes quiméricos descritos en la presente se puedan extender sistémicamente a través de una planta, y así sea posible reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico en células de un vástago no transgénico de una planta injertado en un pie transgénico que comprende los genes quiméricos de la invención (o viceversa), un método que puede ser importante en horticultura, viticultura o producción de frutas.

50 Los siguientes Ejemplos no limitativos describen la construcción de genes quiméricos para la reducción de la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés en una célula vegetal y el uso de tales genes. A menos que se indique otra cosa en los Ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo según protocolos estándar como los descritos en Sambrook y cols. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY y en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel y cols. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, EE. UU. de A. Materiales y métodos estándar para el trabajo molecular en plantas se describen en Plant Molecular Biology Labfax (1993) de R.D.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications, Reino Unido.

60 A lo largo de la descripción y los Ejemplos, se hace referencia a las siguientes secuencias:

SEQ ID N° 1: secuencia del fragmento del virus Y de la patata del gen Nia usado para la construcción de diversas construcciones de sentido y antisentido, para obtener resistencia al virus.

65 SEQ ID N° 2: secuencia de la región codificante de la construcción de CoP de Gusd del Ejemplo 1.

- 5 SEQ ID N° 3 secuencia de una región no traducida 5' (5'UTR) modificada procedente del virus del mosaico de la cañuela
- SEQ ID N° 4 secuencia del promotor No 4 del virus del trébol subterráneo con potenciador S7.
- SEQ ID N° 5 secuencia del potenciador-promotor No 4 doble del virus del trébol subterráneo.
- 10 SEQ ID N° 6 secuencia de la construcción de CoP para la inhibición de la expresión del gen de  $\Delta 12$ desaturasa.
- SEQ ID N° 7 secuencia del intrón 2 de piruvato ortofosfato dicinasa de Flaveria trinervia.

El siguiente texto libre se incluye en la lista de secuencias:

- 15 <223> fragmento del ORF de NIa
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: región codificante de la construcción de CoP de Gusd
- 20 <223> región codificante de Gus deficiente
- <223> antisentido con respecto al extremo 5' de la región codificante de Gus
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: 5'UTR del virus del mosaico de la cañuela
- 25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Promotor S4 del virus de trébol subterráneo con potenciador S7
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Promotor S4 del virus de trébol subterráneo con potenciador S4
- 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia codificante de la construcción de CoP de desaturasa
- <223> correspondiente al extremo 5' de la región codificante de delta12-desaturasa (fad2), en la orientación de sentido
- 35 <223> correspondiente al extremo 5' de la región codificante de delta12-desaturasa (fad2), en la orientación antisentido
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: intrón 2 de la piruvato ortofosfato dicinasa de Flaveria trinervia

40 Los siguientes ejemplos se presentan a fin de ilustrar más a fondo las realizaciones preferidas de la invención. Sin embargo, no se debe considerar de ningún modo que limiten el amplio alcance de la invención.

#### Ejemplo 1

##### Procedimientos experimentales

##### Construcción génica

45 Se usaron métodos de clonación génica estándar (Sambrook y cols. 1989) para elaborar los genes quiméricos. Una representación esquemática de las construcciones usadas se muestra en las Figuras 1A y 1B.

Los componentes para estas construcciones eran:

- \* Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor procedente del aislado Cabb-JI (35S) (Harpster y cols., 1988)
- 50 \* Terminador de octopina sintasa (ocs-t) (MacDonald y cols., 1991)
- \* Promotor del virus del trébol subterráneo No 4 (S4) (documento WO 9606932)
- \* Terminador del virus del trébol subterráneo No 4 (s4t) (documento WO 9606932)
- \* Potenciador-promotor doble del virus del trébol subterráneo No 4 (S4S4) (SEQ ID N° 5)

\* Promotor del virus del trébol subterráneo No 4 con el potenciador S7 (S7S4) (SEQ ID N° 4)

\* Promotor de ubiquitina de maíz (Ubi) (Christensen y Quail, 1996)

\* Terminador del gen de morfología tumoral 1 de *Agrobacterium* (tm1') (Zheng y cols., 1991)

\* el gen Nia de una cepa australiana del virus Y de la patata (Nia) (SEQ ID N° 1)

5 \* un ADN que codifica un marco de lectura abierto de  $\beta$ -glucuronidasa disfuncional (Gusd) (SEQ ID N° 2 desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 1581)

\* una región no traducida 5' (5'UTR) modificada del virus del mosaico de la cañota (JGMV5') (SEQ ID N° 3).

10 Esta contiene una inserción de un sitio *NcoI* en el codón de iniciación ATG seguida por tres codones de terminación en el marco, y un sitio *PstI* (para la inserción del intrón como en las construcciones 4 y 5 de la Figura 1A). En las construcciones vectoriales 2 y 6 de la Figura 1A, el marco de lectura abierto de Gusd se inserta en el sitio *NcoI*, retirando los codones de terminación; en todas las otras construcciones de la Fig 1A, se inserta aguas abajo del sitio *PstI*.

\* un intrón de catalasa de semillas de ricino (Ohta y cols., 1990) según se modifica por Wang y cols.(1997) ("intrón").

15 Los genes quiméricos se construyeron ensamblando operativamente las diferentes partes según se indica esquemáticamente en la Figura 1A o la Figura 1B e insertando los genes quiméricos obtenidos en los vectores de T-ADN vectores pART27 y pART7 (Gleave, 1992) entre el límite izquierdo del T-ADN y el gen neo quimérico expresable en plantas.

20 El ADN que codifica un marco de lectura abierto de  $\beta$ -glucuronidasa disfuncional (GUSd) se obtuvo al suprimir de una región codificante de *gus* la secuencia entre los dos sitios de restricción *EcoRV*. Para la construcción del gen quimérico que codifica la molécula de ARN que comprende la secuencia nucleotídica tanto de sentido como antisentido para un gen de  $\beta$ -glucuronidasa, se añadió una secuencia al gen Gusd para permitir el apareamiento de bases del extremo 5' a lo largo de 558 bases dando como resultado una secuencia como la representada en SEQ ID N° 2. Esta secuencia se clonó entre el promotor de ubiquitina de maíz y el terminador tm1' y se insertó en un vector de T-ADN.

Se construyeron vectores de T-ADN que comprendían un primer y un segundo gen quimérico de resistencia a virus, en donde el primer gen quimérico consistía en:

1. una secuencia promotora CaMV 35S, acoplada a

30 2. en la orientación de sentido, la secuencia nucleotídica procedente de PVY que codifica bien

- proteína Vpg (véase, p. ej., en N° de Registro de Genbank Z29526 desde el nucleótido 1013 hasta el nucleótido 1583), bien
- parte de la proteína CI (véase, p. ej., el N° de Registro del Genbank M95491 desde el nucleótido 3688 hasta el nucleótido 4215) o bien
- 35 • proteasa (Pro) (véase, p. ej., el N° de Registro de EMBL D00441 desde el nucleótido 5714 hasta el nucleótido 7009), seguida por

3. el terminador S4 del virus del mosaico del trébol subterráneo, según se describe anteriormente.

El segundo gen quimérico consiste en

1. un promotor S4 como el descrito anteriormente, acoplado a

40 2. en la orientación antisentido, la secuencia nucleotídica procedente de PVY que codifica bien

- proteína Vpg, bien

- proteína CI o bien
- proteasa, seguido por

3. el terminador de octopina sintasa que se describe anteriormente.

5 Las secuencias de sentido y antisentido dentro de un vector de T-ADN se derivaron de la misma región codificante de PVY.

Además, se construyeron vectores de T-ADN para el uso en la alteración de la composición de ácidos grasos de un aceite (véase la Fig 2), que comprenden

10 1. un promotor FP1 (promotor de napina específico de semillas truncado, que contiene las secuencias entre -309 y +1, según se describe en Stalberg y cols; enlazado a

2. la secuencia nucleotídica of SEQ ID N° 6, que comprende los 480 pb situados 5' en el ORF que codifica la  $\Delta$ 12 desaturasa de *Arabidopsis thaliana* (Fad2) en la orientación de sentido y en la orientación antisentido, enlazada mediante una secuencia espaciadora de 623 pb; seguida por

3. el terminador procedente del gen de nopalina sintasa.

15 Además, se construyeron vectores de T-ADN para evaluar la influencia de una presencia de una secuencia intrónica en los genes quiméricos que codifican construcciones de CoP. A este fin, se elaboraron construcciones que comprendían:

1. un promotor CamV35S, seguido por

2. el ORF que codifica proteasa procedente de PVY (véase anteriormente) en la orientación de sentido;

20 3. la secuencia de SEQ ID No 7 (que codifica el intrón 2 de piruvato ortofosfato dicinasa de *Flaveria trinervia*)

4. el ORF que codifica proteasa procedente de PVY en la orientación antisentido; y

5. el terminador del gen de octopina sintasa.

#### Transformación de plantas

25 El tejido de *Nicotiana tabacum* (W38) se transformó y se regeneró en plantas enteras esencialmente como se describe por Landsman y cols. (1988). El arroz (*Oryza sativa*) se transformó esencialmente como se describe por Wang y cols. (1997).

#### Sobretransformación de arroz

30 Embriones maduros procedentes de una planta de arroz que expresa actividad de GUS e higromicina fosfotransferasa (HPT) se cortaron de semillas maduras y se pusieron sobre medio inductor de callos durante 7 semanas. Se recuperaron callos de estos cultivos, se incubaron con agrobacterias que contenían diversas construcciones vectoriales binarias durante 2 días, a continuación se pusieron sobre medio callificante que contenía higromicina, bialafós y Timentin™. Durante las cuatro semanas siguientes se desarrollaron callos resistentes a higromicina y bialafós. Estas líneas callosas se mantuvieron sobre medios que contenían higromicina y bialafós durante 2 meses más antes de ensayarse con respecto a la actividad de GUS.

35 Ensayo de GUS

Los callos de arroz se probaron con respecto a la actividad de GUS usando el colorante histoquímico X-glucurónido o el sustrato fluorogénico glucurónido de 4-metil-umbeliferona (MUG) esencialmente como se describe por Jefferson y cols. (1987).

Ejemplo 1. Comparación de genes quiméricos que comprenden la secuencia solo antisentido, solo de sentido o tanto de sentido como antisentido (par complementario (CoP)) para la reducción en la expresión fenotípica de un gen de  $\beta$ -glucuronidasa integrado. (Comparativo)

5 Tejido de arroz transgénico que expresa  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) a partir de un solo transgén (y resistencia a higromicina a partir de un gen *hph*) (líneas V10-28 y V10-67) se sobretransformó usando vectores que contenían el gen *bar* que confiere resistencia a fosfinotricina y diversas construcciones de sentido, antisentido y CoP (véase la Figura 1A) derivadas de un gen GUS lisiado (GUSd). El tejido sobretransformado se mantuvo en un medio de selección de higromicina y bialafós durante 3 semanas y a continuación se analizó con respecto a la actividad de GUS. Se usó un gen GUS lisiado de modo que la expresión a partir de este gen no se superpusiera a la actividad de GUS endógena.

15 Las cifras de la Tabla 2 representan la velocidad de producción de MU medida mediante absorción a 455 nm, con excitación a 365 nm de 1,5  $\mu$ g de proteína total en un volumen de reacción de 200  $\mu$ l. La velocidad se midió a lo largo de 30 min. a 37°C. La lectura para callos de arroz no transgénico era 0,162. Las cifras entre paréntesis que siguen a la descripción de la construcción introducida se refieren a la Figura 1A.

20 Los resultados (Tabla 2) mostraban que la sobretransformación con el vector binario que contiene el gen *bar* sin el gen GUSd no tenía un efecto inactivador sobre la actividad de GUS endógena. La sobretransformación con GUSd en una orientación de sentido o antisentido, con o sin un intrón o un codón de terminación temprano, mostraba algún grado de reducción (en aproximadamente ~25% de los callos analizados) de la actividad de GUS endógena (véanse las dos últimas filas de la Tabla 2 que representan el porcentaje de callos analizados con una lectura de ensayo de MUG de menos de 2,000). Sin embargo, la sobretransformación con una construcción de CoP daba en de aproximadamente 75% a 100% de los callos analizados una reducción de la actividad de GUS endógena. Esta construcción de CoP se diseñó de modo que el extremo 3' del ARNm producido pudiera formar un dúplex con el extremo 5' del transcrito para dar una estructura de "mango de sartén".

30 Estos datos muestran que se puede elaborar un par complementario usando un transcrito autorrenaturalizante, que este diseño es mucho más eficaz que una construcción de sentido o antisentido convencional y que el enfoque se puede usar para reducir la expresión fenotípica de genes presentes en una célula vegetal.

Tabla 2. Ensayo de MUG de Callos de Arroz Sobretransformado

	Casete vectorial (1)	Sentido (2)	Sentido + terminación (3)	+ Sentido + terminación + intrón (4)	Antisentido + terminación + intrón (5)	+ CoP repetida invertida (6)
V10-28	121,0	97,45	38,43	38,88	<u>0,290</u>	<u>0,565</u>
	45,58	6,637	64,16	115,5	<u>0,572</u>	<u>0,316</u>
	99,28	71,60	149,2	133,0	37,2	<u>0,351</u>
	26,17	<u>0,224</u>	<u>0,955</u>	98,46	53,94	<u>0,210</u>
	92,21	<u>0,321</u>	68,32	<u>0,502</u>	105,5	<u>0,701</u>
	108,8	5,290	105,6	39,35	56,73	<u>0,733</u>
	6,432	<u>0,9460</u>	136,6	<u>1,545</u>	60,36	2,103
	90,80	32,44	140,4	10,36	71,12	119,8
	98,24	128,8	62,38	111,6	13,17	<u>0,717</u>
	93,76	31,28	17,79	14,42	<u>0,424</u>	<u>0,398</u>
		5,023		88,06	26,98	<u>0,315</u>
		40,27		52,28	115,5	<u>0,270</u>
		36,40		30,26	149,7	16,78
		53,24		107,5	66,75	67,28
		29,97		26,75	145,8	<u>0,217</u>
		89,06		105,1	<u>0,534</u>	<u>0,208</u>
		<u>0,256</u>		135,1	9,4	
		68,23		95,04	35,33	
		5,481		71,5		

	Casete vectorial (1)	Sentido (2)	Sentido + terminación (3) +	Sentido + terminación + intrón (4)	Antisentido + terminación + intrón (5)	CoP repetida invertida (6)
V10-67	318,8	93,43	<u>0,199</u>	31,82	<u>1,395</u>	<u>0,472</u>
	109,5	73,19	<u>0,197</u>	58,08	152,4	<u>0,256</u>
	30,35	128,1	<u>0,157</u>	56,32	67,42	<u>0,296</u>
	40,04	<u>1,506</u>	128	44,62	12,11	<u>0,452</u>
	228	140,6	130,3	<u>0,454</u>	<u>0,668</u>	<u>0,422</u>
	23,05	<u>1,275</u>	196,2	17,32	23,34	<u>0,196</u>
	241,2	<u>0,272</u>	12,43	73,2	76,10	<u>0,294</u>
	118,5	<u>0,209</u>	140,0	20,32	130,1	<u>0,172</u>
	11,27	42,05	90,13	107,4	<u>0,841</u>	<u>0,436</u>
	110,6	117,5	157,4	<u>0,453</u>	66,12	<u>0,398</u>
	19,29	118,9	<u>0,518</u>	87,81	136,9	<u>0,242</u>
	121,0	21,44	<u>0,231</u>	<u>0,299</u>	67,92	
	115,1	155,0	116,1	<u>0,206</u>	50,32	
	77,1	190,9	43,18	12,47	170,3	
	106,1	<u>0,773</u>	31,06	<u>0,213</u>	108,9	
	73,12	<u>0,146</u>		11,15	<u>1,241</u>	
	29,97			19,22	4,092	
	50,11				169,6	
	80,34				76,88	
	117,8				22,08	
	159,1				91,6	
	67,52				7,855	
	92,32				69,76	
	27,97				<u>0,822</u>	
V10-28	0%	21%	10%	10,5%	22%	75%
V10-67	0%	37,5%	33%	29,5%	21%	100%

Ejemplo 2. Comparación de la eficacia de usar genes quiméricos que comprenden solamente genes antisentido, solamente genes de sentido o ambos genes simultáneamente para obtener resistencia a virus en plantas transgénicas (Comparativo).

5 Se elaboraron construcciones génicas usando la secuencia que codifica proteasa de PVY (SEQ ID N° 1) en una orientación de sentido, una orientación antisentido y en una orientación de par complementario (CoP), donde el T-ADN comprendía genes quiméricos tanto de sentido como antisentido, cada uno bajo el control de su propio promotor. En las tres disposiciones, se usó el promotor CaMV35S. Se elaboraron cinco versiones diferentes de construcciones de CoP en las que el segundo promotor era bien el promotor CaMV35S, bien el promotor S4, bien el promotor S4 doble, bien el promotor S4 potenciado con S7, o bien el promotor *rolC* específico de la vasculatura (véase la Figura 1 B).

15 Estas construcciones se transformaron en tabaco (a través de transferencia de ADN mediada por *Agrobacterium*) y se recuperaron aproximadamente 25 plantas transformadas independientemente por construcción de gen quimérico. Las plantas transgénicas se transfirieron a tierra y se mantuvieron en el invernadero. Aproximadamente 1 mes después de trasplantar a la tierra, las plantas fueron inoculadas manualmente con virus Y de patata, usando métodos de aplicación estándar. Dos y cuatro semanas más tarde las plantas se puntuaron con respecto a los síntomas del virus. Los resultados (Tabla 3) mostraban que después de 1 mes, 2 de 27 plantas que comprendían

solamente el gen de sentido y 1 de 25 plantas que comprendían solamente el gen antisentido no mostraban síntomas.

5 En contraste, respectivamente, 11 de 24 (construcción 35S-Nia/S4-Nia antisentido), 7 de 25 (construcción 35S-Nia/RoIC-Nia antisentido), 10 de 27 (construcción 35S-Nia/35S-Nia antisentido), 7 de 26 (construcción 35S-Nia/S4S4-Nia antisentido) y 7 de 25 (construcción 35S-Nia/S7S4-Nia antisentido) plantas que contenían los genes tanto de sentido como antisentido no mostraban síntomas. Se consideró que las plantas que no mostraban síntomas mostraban resistencia extrema a PVY. Continuaban sin mostrar síntomas durante 2 meses más de comprobación (indicado como resistencia (ER) en la Tabla 3). Algunas otras plantas, particularmente las que contenían construcciones de CoP, mostraban un retraso y una restricción de los síntomas. No mostraban síntomas 2 semanas después de la inoculación pero mostraban algunas pequeñas lesiones en algunas plantas después de 4 semanas. Estas plantas estaban claramente mucho menos afectadas por PVY que los tabacos no transgénicos o sensibles y se puntuaron como resistentes (indicado como ER\* en la Tabla 3).

15 Tabla 3 Resistencia a infección por PVY de plantas de tabaco transgénicas que comprenden bien la construcción de proteasa de PVY química de sentido, bien la construcción de proteasa de PVY química antisentido bien ambas (diferentes construcciones de CoP).

Gen de sentido	Gen antisentido	Plantas con resistencia extrema (ER)	Plantas "resistentes" (ER*)	Número total de plantas transgénicas
35S-Nia		2	2	27
	35S-Nia antisentido	1	0	25
35S-Nia	35S-Nia antisentido	10	2	27
35S-Nia	S4-Nia antisentido	11	2	24
35S-Nia	RoIC-Nia antisentido	7	3	25
35S-Nia	S4S4-Nia antisentido	7	7	26
35S-Nia	S7S4-Nia antisentido	7	4	25

20 Los datos muestran que usar construcciones de CoP da como resultado una frecuencia muy superior de plantas transgénicas con resistencia extrema y resistencia que al usar construcciones bien de sentido o bien antisentido solas.

25 Posteriormente, se determinó el número de copias de los transgenes en las plantas transgénicas resistentes a virus. Por lo tanto, se extrajo ADN de todas las plantas transgénicas que mostraban resistencia extrema o resistencia. También se extrajo ADN de cinco plantas sensibles para cada construcción. El ADN se examinó con respecto al número de copias usando análisis Southern. Los datos (Tabla 4) mostraban que los genomas de algunas de las plantas con CoP que mostraban resistencia extrema, particularmente las plantas 35S-Nia/S4-Nia antisentido, solo contenían una única copia de la construcción génica.

30 Tabla 4. Número de copias de transgenes que comprenden la construcción de proteasa de PVY química de sentido, la construcción de proteasa de PVY química antisentido, o ambas (diferentes construcciones de CoP) en plantas con resistencia extrema, resistentes y sensibles.

Gen de sentido	Gen antisentido	Plantas con resistencia extrema (ER)	Plantas "resistentes" (ER*)	Plantas sensibles
35S-Nia		6	1	1/1/1/1/1
	35S-Nia antisentido	4	-	1/8/0/2/1
35S-Nia	35S-Nia antisentido	3/1/2/3/6/3/2/4/2/3	1/1	1/2/2/6/1
35S-Nia	S4-Nia antisentido	2/4/1/3/2/4/6/1/1/3/1	2/6	5/8/2/3
35S-Nia	RoIC-Nia antisentido	6/7/6/7/7/7/6	2/1	2/2/2/1/2
35S-Nia	S4S4-Nia antisentido	1/2/4/5/2/2/2	1/1/2/1/1/1/1	1/1/7/1/1

ES 2 624 549 T3

Gen de sentido	Gen antisentido	Plantas con resistencia extrema (ER)	Plantas "resistentes" (ER*)	Plantas sensibles
35S-Nia	S7S4-Nia antisentido	2/4/12/5/2/2/7	3/2/1/2	1/1/3/1/1

Ejemplo 3 Herencia de la resistencia extrema en plantas procedentes del Ejemplo 2. (Comparativo)

Plantas procedentes del ejemplo 2 se dejaron autofertilizar y sus semillas se recogieron. Semillas que se originaban de plantas que mostraban resistencia extrema y bajo número de copias de transgenes para las construcciones de CoP 35S-Nia/S4-Nia antisentido y 35S-Nia/35S-Nia y semillas procedentes de las plantas de sentido y antisentido que mostraban resistencia extrema se germinaron y se desarrollaron en el invernadero. También se desarrollaron plantas a partir de semillas recogidas de dos líneas con CoP sensibles, dos líneas solamente con gen de sentido sensibles y dos líneas solamente con gen antisentido sensibles. Veinte plantas de cada línea se seleccionaron con respecto a la uniformidad global de tamaño y el estadio de desarrollo, se pusieron en macetas individuales, se dejó que se recuperaran durante una semana y a continuación se inocularon con PVY. Las plantas se puntuaron con respecto a síntomas virales 2, 4 y 7 semanas después de la inoculación. Los resultados (Tabla 5) mostraban que las ocho líneas de planta de 35S-Nia/S4-Nia antisentido y 35S-Nia/35S-Nia antisentido que contenían una o dos copias génicas mostraban una relación de segregación de aproximadamente 3:1 de resistencia extrema : sensible. La descendencia de la línea solamente con el gen antisentido que había dado resistencia extrema en T<sub>0</sub> y la descendencia de la planta de sentido extremadamente resistente que contenía una copia génica daban relaciones de segregación anormales (2:18; ER:sensible). La descendencia de la planta de sentido que daba resistencia extrema y contenía 6 copias génicas daba una relación ~ 3:1 (ER:sensible). Toda la descendencia de las plantas T<sub>0</sub> sensibles mostraba una sensibilidad completa a PVY.

Estos datos muestran que la resistencia extrema de construcciones de CoP da una expresión estable de la resistencia que se hereda de un modo mendeliano. Esto también indica que, en estas líneas, los loci del CoP de PVY son ~100% eficaces para conferir resistencia extrema mientras los loci transgénicos en la línea antisentido y una de las dos líneas de sentido son solo parcialmente eficaces para conferir resistencia extrema.

Tabla 5.

		35S Nia de sentido y S4 Nia antisentido		35S Nia de sentido y S4 Nia antisentido		35S Nia de sentido		35S Nia antisentido	
		Nº Copias	T1 ER:S	Nº Copias	T1 ER:S	Nº Copias	T1 ER:S	Nº Copias	T1 ER:S
Planta ER	1	1	15:5	1	16:4	6	17:3	4	2:18
	2	1	12:8	2	15:5	1	2:18		
	3	1	14:6	2	16:4				
	4	1	15:5	2	16:4				
Planta									
Sensible	1	8	0:20	1	0:20	1	0:20	1	0:20
	2	2	0:20	1	0:20	1	0:20	8	0:20

Ejemplo 4: Tabaco transgénico extremadamente resistente a virus con diferentes componentes (gen de sentido y gen antisentido) en diferentes loci dentro de la planta transgénica. (Comparativo)

Plantas sensibles a PVY que contenían el transgén de sentido (que contenían copias de transgén individuales; véase la Tabla 6) se cruzaron con plantas sensibles a PVY que contenían el transgén antisentido (que también se había analizado con respecto al número de copias mediante análisis Southern; véase la Tabla 6). Veinte de los descendientes resultantes por cruce se propagaron en el invernadero, a continuación se inocularon con PVY y se almacenaron para la infección viral según se describe en el Ejemplo 2. Se esperaba que la descendencia de los cruces (entre genes individuales/plantas que contienen loci) estuviera en la siguiente relación: ¼ gen de sentido solo, ¼ gen antisentido solo, ¼ que comprende los genes tanto de sentido como antisentido y ¼ que no comprende ningún gen. Los resultados (Tabla 4) muestran que, con una excepción, una proporción de la descendencia de todos los cruces satisfactorios mostraba resistencia extrema, mientras que ninguno de los descendientes de plantas de

sentido autofecundadas o plantas antisentido autofecundadas mostraba resistencia extrema. El cruce que no daba una descendencia extremadamente resistente se derivaba de la planta parental Antisentido 2 (As2) que contenía 8 copias del gen antisentido. Las veinte plantas descendientes de los cruces Sentido 1 (S1)(macho) x Antisentido 1 (As1) (hembra) y Sentido 3 (S3) (hembra) x Antisentido 4 (As4) (macho) se examinaron mediante análisis Southern. Los resultados mostraban que en ambos cruces las plantas que mostraban resistencia extrema (o en un caso resistencia) contenían los genes tanto de sentido como antisentido, mientras que las plantas sin transgenes (nulas), o los genes de sentido o antisentido solos, eran todos sensibles a PVY. Para confirmar adicionalmente esta correlación absoluta entre la presencia de un par complementario (genes de sentido con antisentido) dentro de una planta y la resistencia extrema, todas las plantas descendientes que mostraban resistencia extrema se analizaron mediante transferencias Southern. Los resultados mostraban que cualquier planta extremadamente resistente o resistente contenía genes tanto de sentido como antisentido.

Estos datos muestran que un par complementario da resistencia o resistencia extrema incluso cuando los genes que codifican los genes de sentido y antisentido no están situados simultáneamente en el genoma. El "fenómeno del par complementario" no se debe simplemente a una dosificación incrementada del transgén ya que se esperaría que ¼ de la descendencia autofecundada fuera homocigótica y así tener el doble de dosificación génica, y sin embargo era sensible.

Tabla 6: Resistencia a PVY de las plantas descendientes que resultan de cruces entre plantas de tabaco transgénicas sensibles que comprenden el gen 35S-Nia de sentido (líneas S) y plantas de tabaco transgénicas sensibles que comprenden el gen 35S-Nia antisentido (líneas As).

Progenitor masculino	Progenitor femenino	Plantas extremadamente resistentes (ER)	Plantas "resistentes" (ER*)
S1	As1	8	
S1	As4	6	5
S2	As4	1	3
S3	As4	3	3
S4	As1	7	1
S3	As5	1	2
S4	As2	0	
S4	As4	2	0
S5	As4	9	4
S5	As5	2	3
As4	As4	0	
As5	As5	0	
S2	S2	0	
S4	S4	0	

Las plantas extremadamente resistentes no mostraban síntomas de infección por PVY después de 7 semanas. Las plantas resistentes mostraban lesiones muy pequeñas 7 semanas después de la infección por PVY.

S1, S2, S3, S4 y S5 son plantas de tabaco transgénicas sensibles a PVY que comprenden la construcción génica 35S-Nia de sentido que tienen todas una copia del transgén integrada.

As1, As2, As4 and As5 son plantas de tabaco transgénicas sensibles a PVY que comprenden la construcción génica 35S-Nia antisentido que tienen respectivamente 1, 8, 2 y 1 copias del transgén integradas.

Ejemplo 5. Evaluación del uso de diferentes genes virales como secuencias de ácido nucleico diana en la obtención de genes extremadamente resistentes a virus. (Comparativo)

Los vectores de T-ADN que comprenden los genes de resistencia a virus quiméricos primero y segundo basados en secuencias derivadas de la región codificante para proteasa, las proteínas Vpg o CI procedentes de PVY que se describen en esta solicitud, se usaron para obtener plantas de tabaco transformadas, que posteriormente se estimularon con PVY.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 7.

Construcción	Número de plantas inmunes / Número de plantas transgénicas independientes	
	Réplica 1	Réplica 2
35S-Pro sentido /S4-Pro antisentido	11/24	7/25
35S-Vpg sentido /S4-Vpg antisentido	8/20	6/18
35S-CI sentido /S4-CI antisentido	2/23	1/20

## Ejemplo 6. Inactivación potenciada por intrón

5 Los vectores de T-ADN que comprenden los genes quiméricos que codifican las construcciones de CoP en las que se ha insertado un intrón (intrón 2 de piruvato ortofosfato dicinasa de *Flaveria trinervia*) bien en la orientación de sentido o bien en la orientación antisentido, entre las secuencias de sentido y antisentido correspondientes al ORF que codifica proteasa procedente de PVY (según se describe en otras partes en esta solicitud) se usaron para obtener plantas de tabaco transformadas, que se estimularon posteriormente con PVY. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

10 Tabla 8.

Construcción	Número de plantas inmunes / Número de plantas transgénicas independientes
35S-Pro(sentido)-intrón(sentido)-Pro(antisentido)-Ocs-t	22/24
35S-Pro(sentido)-intrón(antisentido)-Pro(antisentido)-Ocs-t	21/24

Ejemplo 7. Modificación del perfil de aceite usando construcciones de CoP en *Arabidopsis*. (Comparativo)

15 Vectores T-ADN para modificar la composición de ácidos grasos en aceite, extraído de semillas trituradas como se describe en otras partes de esta solicitud, se usaron para introducir el gen quimérico que codifica la construcción de CoP para reducir la expresión (véase la Fig 2A; SEQ ID N° 6) del gen de  $\Delta 12$  desaturasa (Fad2) en *Arabidopsis thaliana*.

20 Para la comparación de la eficacia, se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* en las que la expresión del gen Fad2 se reducía mediante una construcción de cosupresión planeada, que comprendía el promotor específico de semillas FPI acoplado al ORF completo procedente del gen de  $\Delta 12$  desaturasa (Fad2) en *Arabidopsis thaliana* y el promotor de nopalina sintasa (véase la Fig 2B).

Como plantas de control, se usaron *Arabidopsis* transgénicas transformadas mediante construcciones de T-ADN no relacionadas.

25 Las semillas se recogieron, se trituraron y se extrajeron y se determinó el porcentaje de los principales ácidos grasos en el aceite mediante métodos disponibles en la técnica. Los resultados, que son la media de dos lecturas, se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9.

Muestra	Nombres de los Picos ----->		Palmitoleico	Esteárico	Oleico	Linoleico	Linolénico	20:0	20:1	22:0	22:1	24:0	C18:1/(C18:2 + C18:3)
	Mirístico	Palmitico											
Horquilla 1.1	0,00	6,06	0,52	3,21	56,65	7,50	6,82	1,46	16,02	0,00	1,76	0,00	3,95
Horquilla 1.2	0,12	6,86	0,39	3,40	51,28	10,00	8,73	1,64	15,60	0,00	1,97	0,00	2,74
Horquilla 1.3	0,11	8,47	0,50	3,49	21,64	28,99	18,51	2,02	14,19	0,00	2,09	0,00	0,46
Horquilla 1.4	0,00	6,14	0,50	3,37	51,70	9,77	8,02	1,73	16,04	0,00	2,05	0,67	2,91
Horquilla 2.1	0,06	5,19	0,43	3,33	54,84	5,52	7,76	1,77	18,50	0,34	1,83	0,45	4,13
Horquilla 2.2	0,04	7,67	0,46	3,75	19,60	28,29	18,64	2,55	15,96	0,19	2,28	0,56	0,42
Horquilla 3.1	0,00	7,99	0,53	3,62	19,52	28,41	19,24	2,32	15,14	0,00	2,23	0,99	0,41
Horquilla 3.2	0,09	7,00	0,54	3,69	49,02	11,03	9,64	1,71	14,94	0,00	1,72	0,62	2,37
Horquilla 3.3	0,00	5,68	0,49	3,98	46,19	12,82	9,71	2,10	16,70	0,00	1,94	0,39	2,05
Horquilla 3.4	0,17	7,19	0,77	3,69	45,90	11,86	10,65	1,84	15,39	0,00	1,90	0,65	2,04
Horquilla 3.5	0,00	6,45	0,48	3,26	51,76	8,13	10,04	1,51	16,08	0,00	1,92	0,36	2,85
Horquilla 3.6	0,08	7,51	0,23	3,59	19,97	29,13	20,12	2,15	14,54	0,29	2,02	0,36	0,41
Horquilla 3.7	0,14	7,20	0,78	2,90	26,37	24,81	17,18	1,92	15,50	0,36	2,30	0,53	0,63
Horquilla 3.8	0,11	6,34	0,46	3,23	38,58	15,25	13,54	1,89	16,91	0,00	2,36	1,34	1,34
Horquilla 3.9	0,00	6,47	0,49	3,32	47,59	11,44	9,63	1,68	15,96	0,00	1,88	1,55	2,26
Horquilla 3.10	0,00	6,77	0,56	3,48	53,30	7,57	9,34	1,55	15,65	0,00	1,79	0,00	3,15
Horquilla 3.11	0,00	7,05	0,59	3,61	53,62	8,87	8,36	1,55	14,35	0,00	1,99	0,00	3,11
Horquilla 3.12	0,05	8,32	0,36	3,85	18,48	29,24	19,94	2,48	14,75	0,00	2,28	0,26	0,38
Horquilla 4.1	0,09	6,97	0,59	3,61	53,64	8,40	8,44	1,60	15,00	0,00	1,66	0,00	3,19
Horquilla 4.2	0,07	6,81	0,22	3,27	55,06	9,16	8,71	1,26	13,63	0,19	1,33	0,30	3,08
Horquilla 4.3	0,04	6,81	0,50	3,47	46,21	10,67	11,52	1,81	16,50	0,00	1,88	0,58	2,08
Horquilla 5.1	0,00	8,30	0,23	3,71	17,72	28,92	20,63	2,38	14,77	0,00	2,41	0,92	0,36
Horquilla 5.2	0,19	7,15	1,55	3,56	44,58	11,44	11,59	1,77	15,67	0,00	1,84	0,65	1,94
Horquilla 5.3	0,10	6,49	0,40	3,72	54,19	7,01	7,89	1,74	15,91	0,00	1,92	0,62	3,64
Horquilla 5.5	0,12	6,58	0,51	3,84	54,48	6,16	7,23	1,77	16,50	0,42	1,90	0,48	4,07

Muestra	Nombres de los Picos ----->		Esteárico	Oleico	Linoleico	Linolénico	20:0	20:1	22:0	22:1	24:0	C18:1/(C18:2 + C18:3)
	Mirístico	Palmitico										
Horquilla 5.6	0,00	6,67	3,66	46,32	11,56	10,48	1,83	15,99	0,00	2,15	0,84	2,10
Horquilla 5.7	0,00	5,50	3,58	57,33	4,75	5,91	1,75	18,03	0,00	1,88	0,76	5,38
Horquilla 5.8	0,16	6,55	3,54	48,52	9,91	8,97	1,78	16,39	0,00	1,84	0,81	2,57
Horquilla 6.1	0,10	6,35	3,48	59,00	4,77	6,26	1,48	15,95	0,00	1,80	0,25	5,35
Horquilla 6.2	0,10	7,98	4,06	20,96	29,01	18,69	2,38	13,63	0,20	2,03	0,60	0,44
Horquilla 6.5	0,08	6,21	3,61	60,05	5,07	5,27	1,55	15,20	0,00	1,69	0,66	5,81
Columbia pBin 19 control	0,08	8,81	3,51	17,07	30,31	20,94	1,78	14,56	0,00	2,17	0,28	0,33
Cosupresión 1.1	0,08	8,16	3,71	26,16	23,77	18,15	2,06	14,65	0,17	1,89	0,57	0,62
Cosupresión 1.2	0,00	8,49	3,65	17,90	29,93	20,36	2,34	14,25	0,00	2,33	0,23	0,36
Cosupresión 1.3	0,07	6,65	3,42	38,34	15,25	14,16	1,91	17,19	0,31	1,94	0,35	1,30
Cosupresión 1.4	0,00	8,22	3,82	18,27	28,82	19,63	2,56	14,83	0,00	2,46	0,83	0,38
Cosupresión 1.5	0,00	7,51	3,84	34,59	17,90	14,64	2,18	16,27	0,00	2,02	0,54	1,06
Cosupresión 1.6	0,07	7,44	3,16	23,97	27,32	17,29	2,03	15,52	0,18	2,22	0,33	0,54
Cosupresión 2.1	0,07	7,46	3,00	23,91	27,21	17,79	1,84	15,27	0,30	2,14	0,58	0,53
Cosupresión 2.2	0,00	8,19	4,22	18,59	28,31	18,80	2,77	15,51	0,00	2,46	0,58	0,39
Cosupresión 2.3	0,00	8,71	3,48	19,21	30,06	19,49	2,03	13,78	0,00	2,15	0,63	0,39
Cosupresión 3.1	0,06	7,57	3,83	32,24	20,00	15,66	2,06	15,65	0,34	1,85	0,23	0,90
Cosupresión 4.1	0,00	7,29	3,55	30,26	21,17	17,06	2,01	16,08	0,00	1,92	0,25	0,79
Cosupresión 4.2	0,08	8,02	3,62	33,04	20,04	15,68	1,80	14,72	0,00	1,88	0,58	0,92
Cosupresión 4.3	0,07	8,35	3,85	30,02	21,72	16,78	2,01	14,25	0,00	1,92	0,49	0,78
Cosupresión 4.4	0,06	6,98	3,62	43,38	13,24	12,77	1,74	15,37	0,30	1,67	0,33	1,67
Cosupresión 4.5	0,13	7,84	3,76	33,76	18,16	16,21	1,89	14,96	0,35	1,85	0,57	0,98
Cosupresión 4.6	0,11	8,18	3,58	19,72	29,19	20,26	2,04	13,92	0,29	1,84	0,55	0,40
Cosupresión 4.7	0,11	7,88	3,75	27,40	22,85	17,44	2,08	15,29	0,00	2,04	0,76	0,68
Cosupresión 4.8	0,13	7,56	3,46	32,27	20,50	15,45	1,90	15,47	0,00	2,02	0,83	0,90
Cosupresión 4.9	0,09	7,46	3,75	36,11	16,96	15,74	1,92	15,38	0,31	1,74	0,25	1,10

Muestra Nombre	Nombres de los Picos ----->		Esteárico	Oleico	Linoleico	Linolénico	20:0	20:1	22:0	22:1	24:0	C18:1/(C18:2 + C18:3)
	Mirístico	Palmitico										
Cosupresión 5.1	0,10	7,68	3,88	36,00	16,77	15,38	1,90	15,44	0,32	1,82	0,36	1,12
Cosupresión 5.2	0,08	7,56	3,58	26,10	25,11	17,79	1,96	15,03	0,30	1,72	0,54	0,61
Cosupresión 5.3	0,08	7,38	3,56	42,24	13,33	13,32	1,76	15,19	0,16	1,61	1,18	1,59
Cosupresión 6.1	0,08	8,04	3,68	31,37	20,29	17,17	1,84	14,31	0,00	1,76	0,95	0,84
Cosupresión 6.2	0,00	8,50	3,91	18,59	29,33	19,66	2,46	14,75	0,00	2,28	0,00	0,38
Control c24 pGNAP-p450	0,07	8,30	4,78	19,68	25,91	20,56	2,97	15,29	0,31	1,79	0,24	0,42

5 El análisis de los resultados indica que las plantas transgénicas que alojan una construcción de CoP (indicada como "horquilla x.x" en la tabla) tienen una frecuencia superior de plantas con aceite en las que el incremento en el ácido oleico y la disminución concomitante en el ácido linolénico y linoleico es significativa que en plantas transgénicas que alojan construcción de cosupresión. Por otra parte, los niveles absolutos de incremento, y respectivamente disminución, son superiores, y respectivamente inferiores, que en plantas transgénicas que alojan construcciones de cosupresión

Ejemplo 7. Modificación del perfil de aceite usando construcciones de CoP en Brassica. (Comparativo)

10 El vector T-ADN que aloja el gen quimérico que codifica la construcción de CoP descrito en el Ejemplo 6 se introduce en colza Brassica.

Semillas recogidas de especies de Brassica transgénicas se trituran y se extrae el aceite y se analiza la composición de los ácidos grasos.

15 El aceite procedente de especies de Brassica transgénicas que alojan la construcción de CoP tiene un contenido de ácido oleico significativamente incrementado y un contenido de ácido linoleico y linolénico disminuido. Un vector de T-ADN que aloja un gen quimérico que codifica una construcción de CoP similar al descrito en el Ejemplo 6, pero en el que la secuencia de la región de sentido y antisentido correspondiente al ORF que codifica  $\Delta 12$  desaturasa se basa en un ORF homólogo procedente de especies de Brassica, se construye y se introduce en colza Brassica.

20 La secuencia de ORF de especies de Brassica homólogos a ORF que codifica  $\Delta 12$  desaturasa procedente de Arabidopsis está disponible de la base de datos Genbank bajo los n° de Registro AF042841 y AF124360.

25 Semillas recogidas de la especie de Brassica transgénica se trituran y se extrae el aceite y se analiza la composición de los ácidos grasos en el aceite. El aceite procedente de una especie de Brassica transgénica que aloja la construcción CoP tiene un contenido de ácido oleico significativamente incrementado y un contenido de ácido linoleico y linolénico disminuido.

Ejemplo 8. Supresión de un gen de resistencia a roya endógeno en lino. (Comparativo)

Se elaboró una construcción de CoP para la supresión del gen de resistencia a roya endógeno, que consistía en

1. un promotor CaMV35S; enlazado operativamente a
- 30 2. parte de un gen de resistencia a roya endógeno (n) procedente de lino (aproximadamente 1500 pb de longitud) en la orientación de sentido; ligada a
3. una parte similar del gen de resistencia a roya endógeno procedente de lino (aproximadamente 1450 pb de longitud) en la orientación antisentido de modo que se genere una repetición invertida perfecta sin secuencia espaciadora en la que cada repetición tiene una longitud de aproximadamente 1450 pb; seguida por
- 35 4. un terminador nos.

Se elaboraron construcciones antisentido planificadas usando un fragmento similar al descrito bajo 3 anteriormente insertado entre un promotor CaMV35S y un terminador nos.

40 Plantas de lino que contenían el gen n (que da resistencia a una cepa de roya del lino) se transformaron mediante estas construcciones de CoP y antisentido. Si se produce la supresión, las plantas se hacían sensibles a la cepa de roya. Si la construcción no tiene efecto, las plantas transformadas permanecen resistentes a la cepa de roya.

Resultados

ngc-b sentido/antisentido 3 suprimidas de 7

ngc-b antisentido 0 suprimidas de 12

45 Aunque la invención se ha descrito e ilustrado en la presente mediante referencias a material, procedimientos y ejemplos específicos diversos, se entiende que la invención no se restringe al material, las combinaciones de material y los procedimientos particulares seleccionados con ese propósito. Se pueden suponer numerosas variaciones de estos detalles y serán apreciadas por los expertos en la técnica.

**REFERENCIAS**

- An y cols. (1996) *The Plant Cell* 8, 15-30
- Barry y cols. (1993) *Proc Natl Acad Sci* 90, 4557-4561
- Baulcombe (1996) *Plant Cell* 8, 1833-1844
- 5 Braun and Hemenway (1992) *Plant Cell* 4, 735-744
- Brederode y cols. (1995) *Virology* 207, 467-474
- Carr y cols. (1992) *Mol. Plant-Microb. Interact.* 5, 397-404
- Christensen and Quail (1996) *Transgenic Research* 5, 213-218
- 10 Croy *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) BIOS Scientific Publications Ltd (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications, Reino Unido.
- de Carvalho Niebel y cols. (1995) *Plant Cell* 7, 347-358
- English y cols. (1996) *Plant Cell* 8, 179-188
- Fire y cols. (1998) *Nature* 391, 806-811
- Fromm y cols. (1990) *Bio/Technology* 8: 833
- 15 Gleave, (1992) *Plant Mol. Biol.* 20: 1203-1207
- Goodwin y cols. (1996) *Plant Cell* 8, 95-105
- Gordon-Kamm y cols. (1990) *The Plant Cell* 2: 603
- Harpster y cols. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 212, 182-190
- Hobbs y cols. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15, 851-864
- 20 Hudspeth y cols. (1989) *Plant Mol Biol* 12: 579-589
- Ingelbrecht y cols. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10502-10506
- Jefferson y cols. (1987) *EMBO J.* 6, 3901-3907
- Kawchuck y cols. (1991) *Molecular plant-microbe interactions* 4, 247-253.
- Keil y cols. (1989) *EMBO J.* 8: 1323-1330
- 25 Keller y cols. (1988) *EMBO J.* 7: 3625-3633
- Keller y cols. (1989) *Genes Devel.* 3: 1639-1646
- Landsman y cols. (1988) *Mol Gen Genet* 214, 68-73
- Lindbo & Dougherty (1992a) *Mol. Plant Micr. Int* 5, 144-153
- Lindbo & Dougherty (1992b) *Virology* 189, 725-733

- Lindbo y cols. (1993) *Plant Cell* 5, 1749-1759
- Longstaff y cols. (1993) *EMBO J.* 12, 379-386
- MacDonald y cols. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19, 5575-5581
- Metzlaff y cols. (1997) *Cell* 88, 845-854
- 5 Meyer y cols. (1987) *Nature* 330: 677
- Mueller y cols. (1995) *Plant J.* 7, 1001-1003
- Ohta y cols. (1990) *Plant Cell. Physiol.* 31, 805-813
- Pang y cols. (1996) *Plant J.* 9, 899-909
- Peleman y cols. 1989 *Gene* 84: 359-369
- 10 Powell-Abel y cols. (1986) *Science* 232, 738-743
- Powell y cols. (1990) *Virology* 175, 124-130
- Que y cols. (1998) *The Plant Journal* 13, 401-409
- Sambrook y cols. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- 15 Sanford y Johnston, (1985) *J. Theor. Biol.* 113, 395-405
- Schiebel y cols. (1993a) *Journal of Biological Chemistry* 268: 11851-11857
- Schiebel y cols. (1993b) *Journal of Biological Chemistry* 268: 11858-11867
- Smith y cols. (1994) *Plant Cell* 6, 1441-1453
- Stalberg y cols., *Plant Molecular Biol.* 23, 671-683
- 20 Stam y cols. (1997) *Ann. Botan.* 79, 3-12
- Wagner and Sun (1998) *Nature* 391, 744-745
- Wang y cols. (1997) *Journal of Genetics and Breeding* 3
- Wilbur and Lipmann (1983) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 726
- Zheng y cols. (1991) *Plant Physiol.* 97, 832-835
- 25 Zuker and Stiegler (1981) *Nucl. Acids Res.* 9, 133-148

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation

<120> Métodos y medios para obtener fenotipos modificados

<130> B07305B - CA

5 <150> US SN 09/056,767

< 151> 1998-03-08

<150> US SN 09/127,735

< 151> 1998-08-03

<160> 7

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

< 211> 854

< 212> ADN

< 213> Virus Y de la patata

15 <400> 1

```

aagctttgaa gattgatttg atgccacata acccactcaa aatttgtgac aaaacaaatg      60
gcattgccaa atttcctgag agagagttcg agctaaggca gactgggcca gctgtagaag      120
tcgacgtgaa ggacatacca gcacaggagg tggaacatga agctaaatcg ctcatgagag      180
gcttgagaga cttcaacca attgccaaa cagttttagtag gctgaaagta tctgttgaat      240
atgggacatc agagatgtac ggttttggat ttggagcgta cataatagcg aaccaccatt      300
tgttcaggag ttataatggt tccatggagg tacgatccat gcacggtaca ttcagggtaa      360
agaatctaca cagtttgagc gttctgccaa ttaaaggtag ggacatcatc ctcattaaaa      420
tgccaaaaga tttccctgtc tttccacaga aattgcattt ccgagctcct acacagaacg      480
aaagaatttg tttagttgga accaactttc aggagaagta tgcacgctcg atcatcacag      540
aagcaagcac tacttacaat ataccaggca gcacattctg gaagcattgg attgaaacag      600
ataatggaca ctgtggacta ccagtggtga gcaactgcca tggatgtcta gtcggaattc      660
acagtttggc aaacaatgca cacaccacga actactactc agccttcgat gaagattttg      720
aaagcaagta cctccgaacc aatgagcaca atgaatgggt caagtcttgg atttataatc      780
cagacacagt gttgtggggc ccgttgaaac ttaaagacag cactcctaaa gggttattta      840
aaacaacaaa gctt                                     854
    
```

<210> 2

< 211> 2186

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> región codificante de la construcción de CoP de Gusd

5 <220>

< 221> características diversas

< 223> región codificante de Guus deficiente

<220>

< 221> características diversas

10 < 223> antisentido con respecto al extremo 5' de la región codificante de Gus

<400> 2

ES 2 624 549 T3

atggtacgtc ctgtagaaac cccaaccctg gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60  
 ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcggt ggtgggaaaag cgcgttataa 120  
 gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt tttaacgatc agttcgccga tgcagatatt 180  
 cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240  
 ggccagcgta tcgtgctgcy tttcgatgcy gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300  
 aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccg 360  
 tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtatc accgtttgtg tgaacaacga actgaactgg 420  
 cagactatcc cgcggggaat ggtgattacc gacgaaaacg gcaagaaaaa gcagtcttac 480  
 ttccatgatt tctttaacta tgccggaatc catcgcagcy taatgctcta caccacgccg 540  
 aacacctggg tggacgatat ctaccctgtt cgcgtcggca tccggtcagt ggcagtgaag 600  
 ggcaaacagt tcctgattaa ccacaaaccg ttctacttta ctggctttgg tcgtcatgaa 660  
 gatgcygact tgcgtggcaa aggattcgat aacgtgctga tgggtgcacga ccacgcatta 720  
 atggactgga ttggggccaa ctctaccgt acctcgatt acccttacgc tgaagagatg 780  
 ctcgactggg cagatgaaca tggcatcgtg gtgattgatg aaactgctgc tgtcggcttt 840  
 aacctctctt taggcattgg tttcgaagcy ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcgaa 900  
 gaggcagtca acggggaaac tcagcaagcy cacttacagg cgattaaaga gctgatagcy 960  
 cgtgacaaaa accaccaag cgtggtgatg tggagtattg ccaacgaacc ggataccctg 1020  
 ccgcaaggtg cacgggaata tttcgcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgacccg 1080  
 acgcytccga tcacctgcyt caatgtaatg ttctgcgagc ctcacaccga taccatcagc 1140  
 gatctctttg atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat 1200  
 ttgaaacgg cagagaaggt actggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat 1260  
 cagccgatta tcataccga atacggcgtg gatacgttag ccgggctgca ctcaatgtac 1320  
 accgacatgt ggagtgaaga gtatcagtgt gcatggctgg atatgtatca ccgcytcttt 1380  
 gatcgcgtca gcgccgtcgt cggtaacaag aaagggatct tcaactcgcga ccgcaaaccg 1440  
 caaggcatat tgcgcgtttg cggtaacaag aaagggatct tcaactcgcga ccgcaaaccg 1500  
 aagtcggcgg cttttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaaccg 1560  
 cagcagggag gcaacaatg aaacagacgc gtggttacag tcttgccgga catgcytcac 1620  
 cacggtgata tcgtccacc aggtgttcgg cgtggtgtag agcatacgtc gcyatggatt 1680  
 ccggcatagt taaagaaatc atggaagtaa gactgctttt tcttgccgtt ttcgctcggt 1740  
 atcaccattc ccggcgggat agtctgcccag ttcagttcgt tgttcacaca aacggtgata 1800  
 cgtacacttt tcccggcaat aacatacggc gtgacatcgg cttcaaatgg cgtatagccg 1860  
 ccctgatgct ccatacctt ctgattattg acccacactt tgcgtaatg agtgaccgca 1920  
  
 tcgaaacgca gcacgatacy ctggcctgcc caacctttcg gtataaagac ttcgcyctga 1980  
 taccagacgt tgcccatac attacgaata tctgcatcgg cgaactgatc gttaaaactg 2040  
 cctggcacag caattgcccg gctttctgtg aacgcgcttt cccaccaacg ctgatcaatt 2100  
 ccacagtttt cgcgatccag actgaatgcc cacaggccgt cgagtttttt gatctcacgg 2160  
 gttggggttt ctacaggagc taccat 2186

<210> 3

<211> 208

## ES 2 624 549 T3

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> 5' UTR del virus del mosaico de la cañuela

5 <400> 3

```
cgccccgggc ccaacacaac acaacagaac ctacgtcaat tgattttatc aatcgcaaag    60
ccttacaaag atcttcgcag tcgttcatca acagattcac cgaaccattc ttgtagctc    120
tcgcacagag ataagcagga aaccatggca ggtgagtgga acacagtttg atagtaagag    180
aaaccagagg aagactgcag gtacccgc                                     208
```

<210> 4

< 211> 1150

< 212> ADN

10 < 213> Artificial

<220>

< 223> Promotor S4 del virus del trébol subterráneo con potenciador S7

<400> 4

```
aatctgcagc ggccgcttaa tagtaattat gattaattat gagataagag ttgttattat    60
gcttatgagg aataaagaat gattaatatt gttaattttt attccgcgaa gcggtgtggt    120
atgtttttgt tggagacatc acgtgactct cacgtgatgt ctccgcgaca ggctggcacg    180
gggcttagta ttaccccgtg ccggatcaga gacatttgac taaatattga cttggaataa    240
tagcccttgg attagatgac acgtggacgc tcaggatctg tgatgctagt gaagcgctta    300
agctgaacga atctgacgga agagcggaca tacgcacatg gattatggcc cacatgtcta    360
aagtgtatct ctttacagct atattgatgt gacgtaagat gctttacttc gcttcgaagt    420
aaagtaggaa attgctcgct aagttattct tttctgaaag aaattattta attctaatta    480
aattaaatga gtcgctataa atagtgtcga tgctgcctca catcgtattc ttcttcgcat    540
cgtctgttct ggttttaagc gggatccagg cctcgagata tcggtacctt gttattatca    600
ataaaagaat ttttattggt attgtgttat ttgtaatttt atgcttataa gtaattctat    660
gattaattgt gaattattaa gactaatgag gataataatt gaatttgatt aaattaactc    720
tgcaagcta tatgtctttc acgtgagagt cacgtgatgt ctccgcgaca ggctggcacg    780
gggcttagta ttaccccgtg ccgggatcag agacatttga ctaaagtgtg acttgaataa    840
atagcccttg gattagatga cacgtggacg ctcaggatct gtgatgctag tgaagcgctt    900
aagctgaacg aatctgacgg aagagcggac aaacgcacat ggactatggc ccactgcttt    960
```

15

ES 2 624 549 T3

attaaagaag tgaatgacag ctgtctttgc ttcaagacga agtaaagaat agtgaaaaac 1020  
 gcgtaaagaa taagcgact cagtacgctt cgtggcttta tataaatagt gcttcgtctt 1080  
 attcttcggt gtatcatcaa cgaagaagtt aagctttggt ctgcgtttta atgatcgatg 1140  
 gccagtcgac 1150

<210> 5

< 211> 1052

< 212> ADN

5 < 213> Artificial

<220>

< 223> Promotor S4 del virus del trébol subterráneo con potenciador S4

<400> 5

ggatccaggc ctcgagatat cggtagcttg ttattatcaa taaaagaatt tttattgtta 60  
 ttgtgttatt tggttaattt tgcttataag taattctatg attaattgtg aattattaag 120  
 actaatgagg ataataattg aatttgatta aattaactct gcgaagctat atgtctttca 180  
 cgtgagagtc acgtgatgct tccgcgacag gctggcacgg ggcttagtat taccctgtgc 240  
 cgggatcaga gacatttgac taaatgttga cttggaataa tagcccttgg attagatgac 300  
 acgtggacgc tcaggatctg tgatgctagt gaagcgctta agctgaacga atctgacgga 360  
 agagcggaca aacgcacatg gactatggcc cactgcttta ttaaagaagt gaatgacagc 420  
 tgtctttgct tcaagacgaa gtaaagaata gtgaaaaacg cgtggatcca ggcctcgaga 480  
 tatcgggtacc ttgttattat caataaaaga atttttattg ttattgtgtt atttggtaat 540  
 ttatgcttat aagtaattct atgattaatt gtgaattatt aagactaatg aggataataa 600  
 ttgaatttga ttaaattaac tctgcgaagc tatatgtctt tcacgtgaga gtcacgtgat 660  
 gtctccgca caggctggca cggggcttag tattaccccg tgccgggatc agagacattt 720  
 gactaaatgt tgacttgaa taatagcctt tggattagat gacacgtgga cgctcaggat 780  
 ctgtgatgct agtgaagcgc ttaagctgaa cgaatctgac ggaagagcgg acaaacgcac 840  
 atggactatg gccactgct ttattaaaga agtgaatgac agctgtcttt gcttcaagac 900  
 gaagtaaaga atagtggaac acgcgtaaag aataagcgta ctcagtacgc ttcgtggcct 960  
 tatataaata gtgcttcgct ttattcttcg ttgtatcatc aacgaagaag ttaagctttg 1020  
 ttctgcgttt taatgatcga tggccagtcg ac 1052

10 <210> 6

< 211> 1583

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> secuencia codificante de la construcción de CoP de desaturasa

<220>

< 221> características diversas

< 222> (1)..(480)

5 < 223> correspondiente al extremo 5' de la región codificante de delta12-desaturasa (fad2) en la orientación de sentido

<220>

< 221> características diversas

< 222> (1101)..(1583)

10 < 223> correspondiente al extremo 5' de la región codificante de delta12-desaturasa (fad2) en la orientación antisentido

<400> 6

ES 2 624 549 T3

atcattatag cctcatgctt ctactacgtc gccaccaatt acttctctct cctccctcag 60  
cctctctctt acttggcttg gccactctat tgggcctgtc aaggctgtgt cctaactggt 120  
atctgggtca tagcccacga atgcbggtcac cacgattca gcbgactacca atggctggat 180  
gacacagttg gtcttatctt ccattccttc ctctcgtcc cttacttctc ctggaagtat 240  
agtcatcgcc gtcaccattc caaactgga tccctcgaaa gagatgaagt atttgtccca 300  
aagcagaaat cagcaatcaa gtggtacggg aaatacctca acaaccctct tggacgcatc 360  
atgatgtaa ccgtccagtt tgtcctcggg tggcccttgt acttagcctt taacgtctct 420  
ggcagaccgt atgacgggtt cgcttgccat ttcttccca acgctcccat ctacaatgac 480  
cgagaacgcc tccagatata cctctctgat gcbgggtattc tagccgtctg ttttggctt 540  
taccgttacg ctgctgcaca agggatggcc tcgatgatct gcctctacgg agtaccgctt 600  
ctgatagtga atgcbgttctt cgtcttgatc acttacttgc agcacactca tccctcgttg 660  
cctcactacg attcatcaga gtgggactgg ctcbggggag ctttggctac cgtagacaga 720  
gactacggaa tcttgaacaa ggtgttccac aacattacag acacacacgt ggctcatcac 780  
ctgttctcga caatgccga ttataacgca atggaagcta caaaggcgt aaagccaatt 840  
ctgggagact attaccagtt cbatggaaca ccgtggtatg tagcbgatgta tagggaggca 900  
aaggagtgta tctatgtaga accggacagg gaagggtgaca agaaagggtg gtactggtac 960  
aacaataagt tatgagcatg atgggtgaaga aattgctgac ctttctcttg tctgtttgtc 1020  
ttttgttaa gaagctatgc ttcgttttaa taatcttatt gtccattttg ttgtgttatg 1080  
acattttggc tgctcattat gttcagtaac atctaccctc gcaaccctt ctttaccggt 1140  
cbcttgggca gtagccaga cggctctctc aatttccgat tcatgttccc ggtgggctcc 1200  
tgtttgacct gccaatgta gtactacgca ggttctcca acaactccat aaaggcgtg 1260  
gtgaactaac gactaaagac gaaaccctgt ttatgaagta gagaaagctc cctaggtcac 1320  
aaccttacca ctgccgctac tgatatgaag gtctcttca ttccctgctc ctcttctt 1380  
accttctatt ctggttgaca cbtaggtcg gtaaccatca gcbacttacg caccactggc 1440  
gtaagcacc gatactgggt ctatggtaa tcctgtgtcg gaactgtccg ggttatctca 1500  
cbggttcggt ctattctctc tccgactccc tcctctctct ctattaacca cbgctgcatc 1560  
atcttctgac tccgatatta cta 1583

<210> 7

< 211> 786

< 212> ADN

5 < 213> Artificial

<220>

< 223> intrón 2 de la piruvato ortofosfato dicinasa de Flaveria trinervia

<400> 7

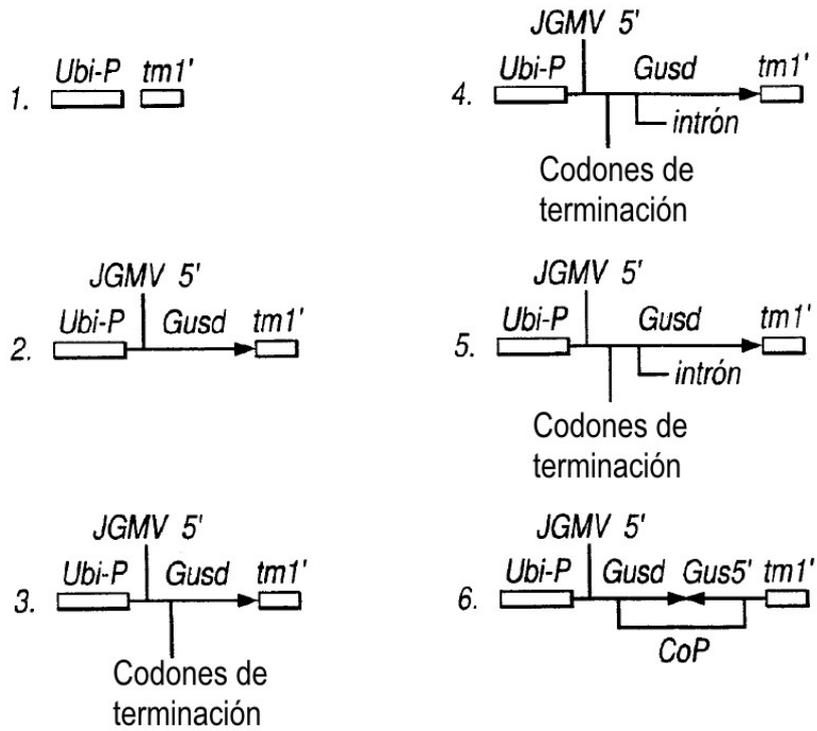
## ES 2 624 549 T3

aagcttgga aggaaataat tttttcttt ttcctttta gtataaata gttaagtgat	60
gttaattagt atgattataa taatatagtt gttataattg tgaaaaata atttataaat	120
atattgttta cataaacaac atagtaatgt aaaaaatat gacaagtgat gtgtaagacg	180
aagaagataa aagttgagag taagtatatt atttttaatg aatttgatcg aacatgtaag	240
atgatatact agcattaata tttgttttaa tcataatagt aattctagct ggtttgatga	300
attaaatatac aatgataaaa tactatagta aaaataagaa taaataaatt aaaataatat	360
ttttttatga ttaatagttt attatataat taaatatcta taccattact aaatatttta	420
gtttaaaagt taataaatat tttgtttagaa attccaatct gcttgtaatt tatcaataaa	480
caaaatatta aataacaagc taaagtaaca aataatatca aactaataga aacagtaatc	540
taatgtaaca aaacataatc taatgctaataaacaagc gcaagatcta tcattttata	600
tagtattatt ttcaatcaac attccttatta atttctaaat aatacttgta gttttattaa	660
cttctaaatg gattgactat taattaaatg aattagtcga acatgaataa acaaggtaac	720
atgatagatc atgtcattgt gttatcattg atcttacatt tggattgatt acagttggga	780
aagctt	786

**REIVINDICACIONES**

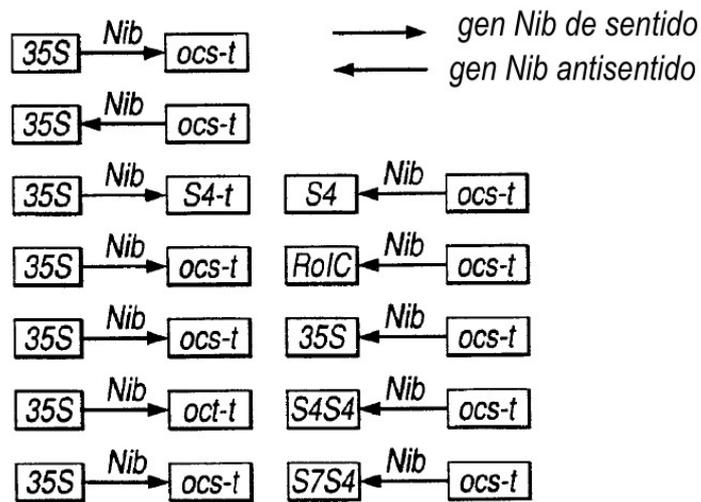
1. Un método para reducir la expresión fenotípica de un ácido nucleico de interés, que se puede expresar en una célula vegetal, que comprende la etapa de introducir en dicha célula un ADN quimérico, que se integra establemente en el genoma nuclear de dicha célula vegetal, comprendiendo dicho ADN quimérico las siguientes partes enlazadas operativamente:
- 5
- a) un promotor, operativo en dicha célula vegetal;
  - b) una región de ADN que, cuando se transcribe, da una molécula de ARN con una secuencia nucleotídica que comprende
    - i. una secuencia nucleotídica de sentido de menos 20 nucleótidos consecutivos que tiene 100% de identidad de secuencia con al menos parte de una región codificante de dicho ácido nucleico de interés; y
    - ii. una secuencia nucleotídica antisentido que incluye al menos 20 nucleótidos consecutivos, que tiene 100% de identidad de secuencia con el complemento de dichos al menos 20 nucleótidos consecutivos de dicha secuencia nucleotídica de sentido;
- 10
- 15 en donde el ARN es capaz de formar una estructura de ARN de horquilla artificial con un tallo de ARN de doble hebra mediante apareamiento de bases entre las regiones con secuencia nucleotídica de sentido y antisentido de modo que al menos dichos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de sentido se apareen por bases con dichos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia antisentido;
- 20 en donde dicho ADN quimérico comprende uno o más intrones en dicha región de ADN que, cuando se transcribe, da una molécula de ARN.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que el ADN quimérico comprende además una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación.
- 25
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha molécula de ARN comprende además una secuencia nucleotídica espaciadora situada entre dicha secuencia nucleotídica de sentido y dicha secuencia nucleotídica antisentido.
- 30
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha secuencia nucleotídica espaciadora comprende un intrón.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha secuencia nucleotídica antisentido tiene una longitud total correspondiente a la de la secuencia nucleotídica de sentido.
- 35
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia nucleotídica antisentido difiere en longitud de la secuencia nucleotídica de sentido en aproximadamente 10%.
7. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha secuencia nucleotídica de sentido tiene una longitud total de al menos 50 nucleótidos.
- 40
8. El método según la reivindicación 1, en el que la molécula de ARN consiste en el ARN de horquilla.
9. El método según la reivindicación 1 o 3, en el que dicho gen es un gen endógeno.
- 45
10. El método según la reivindicación 1 o 3, en el que dicho gen es un transgén extraño.
11. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho ácido nucleico de interés está comprendido en el genoma de un virus infeccioso.
- 50
12. El método según la reivindicación 11, en el que dicho virus infeccioso es un virus de ARN.
13. El método según la reivindicación 1, en el que dicha célula vegetal está comprendida dentro de una planta.
- 55
14. Método según la reivindicación 13, en el que la planta es una planta de cultivo o una hortaliza.
15. Método según la reivindicación 14, en el que la planta es maíz, arroz, trigo, cebada, caña de azúcar, algodón, colza, soja, achicoria, brasicáceas, lechuga, tomate, tabaco, patata o remolacha azucarera.

- 5 16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la expresión fenotípica reducida se usa para obtener resistencia a la rotura, para obtener patrones de color de las flores modificados, para obtener plantas resistentes a nematodos, para retrasar la maduración de los frutos, para obtener androesterilidad, para reducir la presencia de metabolitos secundarios en plantas, para modificar el perfil de metabolitos sintetizados en una célula vegetal mediante ingeniería metabólica, para retrasar la senescencia, para alterar la lignificación, para alterar la calidad de las fibras en el algodón, para incrementar la resistencia a las magulladuras en patatas al reducir la polifenoloxidasas, para obtener resistencia a virus o para obtener resistencia a enfermedades o plagas.
- 10 17. Una célula vegetal que comprende un ácido nucleico de interés, que se puede expresar fenotípicamente, que comprende además una molécula de ADN quimérico integrada establemente en el genoma nuclear de dicha célula vegetal, comprendiendo dicha molécula de ADN quimérico las siguientes partes enlazadas operativamente:
- 15 a) un promotor, operativo en dicha célula vegetal;
- b) una región de ADN que, cuando se transcribe, da una molécula de ARN con al menos una región de ARN con una secuencia nucleotídica que comprende
- 20 i) una secuencia nucleotídica de sentido de al menos 20 nucleótidos consecutivos que tiene 100% de identidad de secuencia con al menos parte de una región codificante del ácido nucleico de interés; y
- ii) una secuencia nucleotídica antisentido que incluye al menos 20 nucleótidos consecutivos, que tiene 100% de identidad de secuencia con el complemento de dichos al menos 20 nucleótidos consecutivos de dicha secuencia nucleotídica de sentido;
- en la que el ARN es capaz de formar una estructura de ARN de horquilla artificial con un tallo de ARN de doble hebra mediante apareamiento de bases entre las regiones con secuencia nucleotídica de sentido y antisentido, y
- 25 en la que dicho gen quimérico comprende uno o más intrones en dicha región de ADN que, cuando se transcribe, da una molécula de ARN.
18. Una célula según la reivindicación 17, en la que la molécula de ADN quimérico comprende además una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación.



Representación esquemática de los genes quiméricos usados en el Ejemplo 1

**Fig. 1A**



Representación esquemática de los genes quiméricos usados en los Ejemplos 2 y 4

**Fig. 1B**

