

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 298**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/00** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2005 PCT/US2005/004541**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2005 WO05077116**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2005 E 05713459 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 1713908**

54 Título: **ADN recombinante para supresión génica**

30 Prioridad:

**10.02.2004 US 543157 P**

**10.02.2004 US 543187 P**

**11.08.2004 US 600859 P**

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

**04.12.2017**

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY, LLC (100.0%)  
800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD  
ST. LOUIS, MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**MALVAR, THOMAS M.;  
HUANG, SHIHSHIEH y  
LUETHY, MICHAEL H.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 645 298 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

ADN recombinante para supresión génica

**Campo de la invención**

5 En el presente documento se describen construcciones de ADN recombinante para producir bucles de supresión génica de ARN antisentido y procedimientos de producción y uso de tales construcciones y plantas transgénicas que expresan bucles de supresión génica de ARN antisentido.

**Antecedentes**

10 Ciertas plantas tienen niveles bajos de aminoácidos específicos en comparación con otras plantas, por ejemplo, el maíz tiene bajo niveles de lisina, metionina y triptófano. Intentos para incrementar los niveles de aminoácidos en plantas transgénicas incluyen expresar ADN recombinante que codifica proteínas en una ruta de síntesis de aminoácidos a niveles mayores que los genes nativos. Uno tal gen para producir niveles aumentados de lisina en maíz es un ácido dihidropicolínico sintasa bacteriana. Un concepto para niveles incluso más aumentados de aminoácidos incluye la supresión de genes que codifican proteínas en las rutas catabólicas de aminoácidos.

15 La supresión génica incluye cualquiera de los procedimientos bien conocidos para la supresión de la transcripción de un gen o la acumulación del ARNm correspondiente a ese gen previniendo de ese modo la traducción del transcrito en proteína. Más particularmente, la supresión génica mediada por inserción de una construcción de ADN recombinante con ADN orientado antisentido para regular la expresión génica en células vegetales está descrita en el documento de patente americana 5.107.065 (Shewmaker y col.) y el documento de patente americana 5.759.829 (Shewmaker y col.). Las plantas transformadas usando tales construcciones de ADN orientado antisentido para la  
20 supresión génica pueden comprender ADN integrado colocado como una repetición invertida que resultó de la inserción conjunta de diversas copias del ADN de transferencia (ADN-T) en plantas mediante transformación mediada por *Agrobacterium*, como es descrito por Redenbaugh y col. en "Safety Assessment of Genetically Engineered Flavr Savr™ Tomato", CRC Press, Inc. (1992). Las inserciones de repetición invertida pueden comprender una parte o todo el ADN-T, por ejemplo, contener una repetición invertida de una construcción  
25 antisentido completa o parcial. El cribado para el ADN insertado que comprende elementos de repetición invertida puede mejorar la eficiencia de identificación de eventos de transformación eficaces para el silenciamiento génico cuando la construcción de transformación es una construcción de ADN antisentido simple.

30 La supresión génica desencadenada mediante la inserción de una construcción de ADN recombinante con ADN orientado sentido para regular la expresión génica en plantas está descrita en el documento de patente americana 5.283.184 (Jorgensen y col.) y el documento de patente americana 5.231.020 (Jorgensen y col.). El ADN-T insertado que proporciona la supresión génica en plantas transformadas con tales construcciones sentido por *Agrobacterium* se organiza en su mayoría en estructuras de repetición invertida, como es descrito por Jorgensen y col., *Mol. Gen. Genet.*, 207:471-477 (1987). Véase también Stam y col., *The Plant Journal*, 12:63-82 (1997) y De Buck y col., *Plant Mol. Biol.* 46:433-445 (2001), quienes usaron estudios de segregación para apoyar el descubrimiento de Jorgensen de que en muchos eventos el silenciamiento génico está mediado por ADN-T transgénico multimérico donde los  
35 ADN-T se colocan en repeticiones invertidas. El cribado para ADN insertado que comprende los elementos de repetición invertida puede mejorar la eficacia del silenciamiento génico cuando se transforma con construcciones simples de ADN orientada sentido.

40 El silenciamiento génico también puede estar afectado por la transcripción de ARN a partir de tanto un ADN orientado sentido como antisentido usando dos unidades de transcripción separadas, por ejemplo, como se describe por Shewmaker y col. en el documento de patente americana 5.107.065 en el que en el Ejemplo 1 se preparó un vector binario con genes *aroA* tanto sentido como antisentido. Construcciones similares se describen en la Publicación Internacional N° WO 99/53050 (Waterhouse y col.). Véase también el documento de patente americana 6.326.193 en el que el ADN dirigido de gen se une de manera operable a promotores opuestos.

45 La supresión génica se puede conseguir en plantas proporcionando construcciones de transformación que son capaces de generar un ARN que pueden formar ARN de doble cadena a lo largo de al menos parte de su longitud. La supresión génica en plantas está descrita en el documento EP 0426195 A1 (Goldbach y col.) en el que las construcciones de ADN recombinante para la transcripción en ARN horquilla proporcionaban plantas transgénicas con resistencia al virus del brocado del tabaco. Véase también Sijen y col., *The Plant Cell*, Vol. 8, 2.277-2.294 (1996) que describe el uso de construcciones que portan repeticiones invertidas (sentido seguido de antisentido) de un gen del virus del mosaico del frijol en plantas transgénicas para mediar la resistencia a virus. Véase también la Publicación Internacional N° 98/53083 (Grierson y col.) y la Publicación de Patente americana relacionada N° 2003/0175965 A1 (Lowe y col.) que describe la supresión génica, usando una construcción de ARN de doble cadena que comprende una secuencia codificadora de gen precedida por una repetición invertida de  
50 5'UTR. Las construcciones para la supresión génica posttranscripcional en plantas por ARN de doble cadena del gen diana también están descritas en la Publicación Internacional N° WO 99/53050 (Waterhouse y col.) y la Publicación Internacional N° WO 99/49029 (Graham y col.). Véase también la Publicación de Solicitud de Patente americana N° 2002/0048814 A1 (Oeller) en la que las construcciones de ADN se transcriben a ARN sentido o

antisentido con una cola de poli(T)-poli(A) que forma horquilla. Véase también la Publicación de Solicitud de Patente americana N° 2003/0018993 A1 (Gutterson y col.) en la que el ADN sentido o antisentido está seguido de una repetición invertida de la región no traducida 3' del gen NOS. Véase también la Publicación de Solicitud de Patente americana N° 2003/0036197 A1 (Glassman y col.) en la que el ARN para reducir la expresión del ARNm diana comprende una parte con homología a ARNm diana y una parte con regiones de ARN complementario que no están relacionadas con el ARN endógeno.

La producción de ARNdc en plantas para inhibir la expresión génica, por ejemplo, en un nematodo que se alimenta de la planta, está descrita en el documento de patente americana 6.506.559 (Fire y col.). Los vectores de supresión génica múltiple para su uso en plantas se describen en la Solicitud de Patente americana N° 2004/0029283 (Fillatti). La supresión transcripcional tal como la supresión de promotor *trans* puede estar afectada por una expresión de una construcción de ADN que comprende un promotor unido de manera operable a repeticiones invertidas de ADN promotor de un gen diana. Construcciones útiles para tal expresión génica mediada por la supresión de promotor *trans* son descritas por Mette y col., *The EMBO Journal*, Vol. 18, pp. 241-148, (1999) y por Mette y col., *The EMBO Journal*, Vol. 19, pp. 5.194-5.201-148, (2000).

## **Sumario**

Esta invención proporciona procedimientos y construcciones de ADN recombinante útiles para producir ARN orientado antisentido para la supresión génica en plantas transgénicas. En un aspecto esta invención proporciona construcciones de ADN recombinante para la supresión de al menos un gen diana de planta nativa que comprende en orden 5' a 3' un elemento promotor unido de manera operable a un primer elemento de ADN orientado antisentido en relación con el al menos un gen diana y un segundo elemento de ADN orientado sentido en relación con el al menos un gen diana que comprende 50 a 5.000 nucleótidos, en las que el elemento de ADN orientado sentido no es más de aproximadamente la mitad de la longitud del elemento de ADN orientado antisentido, y el ARN orientado sentido transcrito por el ADN orientado sentido es complementario al extremo más 5' de ARN orientado antisentido transcrito por el elemento de ADN orientado antisentido, en las que dicho ARN transcrito forma un bucle de ARN orientado antisentido para suprimir dicho al menos un gen diana, y en las que dicho elemento de ADN orientado antisentido comprende, en serie, segmentos de dos o más genes dirigidos para supresión.

El ADN orientado sentido se puede clonar como una repetición invertida del segmento más 5' del elemento de ADN orientado antisentido. Las construcciones con tal ADN orientado sentido se transcriben a ARN que forma un bucle de ARN orientado antisentido cerrado en sus extremos con un segmento de ARN de doble cadena (ARNdc), por ejemplo, como se ilustra en la Figura 1. Para formar un bucle de ARN orientado antisentido el elemento de ADN complementario convenientemente es no más de aproximadamente la mitad de la longitud del elemento de ADN orientado antisentido, con frecuencia no más de un tercio de la longitud de dicho elemento de ADN orientado antisentido, por ejemplo, no más de un cuarto de la longitud de dicho elemento de ADN orientado antisentido. Las longitudes totales de los elementos de ADN combinados pueden variar. Por ejemplo, el elemento de ADN orientado antisentido puede consistir en de 500 a 5.000 nucleótidos y el elemento de ADN complementario puede consistir en de 50 a 500 nucleótidos. En muchos casos es útil para el segmento de ADN orientado antisentido ser más de dos veces la longitud del segmento de ADN orientado sentido para permitir la formación de un bucle de ARN orientado antisentido.

La transcripción antisentido está diseñada para suprimir genes múltiples en los que el ADN está colocado con dos o más elementos orientados antisentido de diferentes genes dirigidos para supresión seguidos de un elemento orientado sentido complementario, por ejemplo, complementario a al menos una parte del elemento antisentido más 5'. Esta invención proporciona además un procedimiento para generar ARN orientado antisentido en una planta para la supresión de un gen diana, proporcionando dicho procedimiento en células de dicha planta una construcción de ADN recombinante de esta invención. En el presente documento también se describen procedimientos de supresión de la expresión de un gen al proporcionar en las células de una planta una construcción de ADN recombinante de supresión de gen que transcribe un bucle antisentido de ARN.

En las construcciones y procedimientos de esta invención el gen dirigido para silenciamiento es un gen nativo.

## **Breve descripción del dibujo**

La Figura 1 es una ilustración esquemática de una construcción de ADN recombinante útil en esta invención para producir un bucle orientado antisentido de ARN.

La Figura 2 es un análisis tipo Western que indica la supresión génica usando una construcción de esta invención.

La Figura 3 muestra espectros de espectroscopía de masas que indican el contenido de zeina en semillas.

## **Descripción detallada**

Las SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 son secuencias de nucleótidos de construcciones de ADN recombinante útiles para transcribir ARN que puede formar un bucle de ARN orientado antisentido para suprimir uno o múltiples genes en plantas transgénicas. Véase las Tablas 1 y 2 para una descripción de elementos de aquellas construcciones.

Como se usa en el presente documento, "complementario" se refiere a polinucleótidos que son capaces de hibridar, por ejemplo, cadenas sentido y antisentido de ADN o cadenas autocomplementarias de ARN, debido a la complementariedad de nucleótidos alineados permitiendo el enlace de C-G y A-T o A-U.

5 Como se usa en el presente documento, "vector" significa una molécula de ADN capaz de replicación en una célula hospedadora y/o a la cual otro segmento de ADN se puede unir de manera operable para provocar la replicación del segmento unido. Un plásmido es un vector ilustrativo.

10 Como se usa en el presente documento, una planta o semilla "transgénica", es una cuyo genoma se ha alterado por la incorporación de ADN recombinante que comprende material genético exógeno o copias adicionales de material genético nativo, por ejemplo, por transformación o recombinación de la planta. Las plantas transgénicas incluyen plantas progenie de una planta original derivadas a partir de un procedimiento de transformación que incluye la progenie de plantas transgénicas de reproducción con plantas de tipo silvestre u otras plantas transgénicas. Plantas de cultivo de particular interés en la presente invención incluyen maíz, soja, algodón, canola (colza), trigo, arroz, girasol, cártamo y lino. Otros cultivos de interés incluyen plantas productoras de verduras, fruta, césped y madera.

### Construcciones de ADN recombinante para la transformación de planta

15 Las construcciones de ADN recombinante para producir agentes de supresión génica de ARN antisentido en bucle, en plantas transgénicas pueden ser fácilmente preparados por los expertos en la técnica. Generalmente, tal construcción de ADN comprende como mínimo un promotor activo en el tejido dirigido para supresión, un elemento de ADN que se puede transcribir que tiene una secuencia que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un gen dirigido para supresión y un elemento terminador de transcripción. El elemento de gen dirigido copiado para su uso en el ADN que se puede transcribir en la construcción de supresión génica puede ser un elemento promotor, un elemento intrón, un elemento exón, un elemento 5' UTR, o un elemento 3' UTR. Aunque el tamaño mínimo de ADN copiado de la secuencia de un gen dirigido para supresión se cree que es aproximadamente de 21 o 23 nucleótidos; se prefieren segmentos de nucleótidos más largos, por ejemplo, más de la longitud completa de un gen dirigido. Las longitudes útiles de cada segmento de ADN están en el intervalo de 50 a 5.000 nucleótidos, dicho ADN orientado antisentido de 500 a 5.000 nucleótidos de longitud y los elementos de ADN complementario pueden ser de 50 a 500 o más nucleótidos de longitud. El elemento de ADN puede comprender múltiples partes de un gen, por ejemplo, nucleótidos que son complementarios a elementos génicos contiguos o separados de UTR, exón e intrón. Tales construcciones también pueden comprender otros elementos reguladores, ADN que codifica péptidos de tránsito, péptidos señal, marcadores selectivos y marcadores que se pueden someter a cribado como se desee.

30 Con referencia a la Figura 1 se ha mostrado esquemáticamente una construcción de ADN recombinante que comprende un elemento promotor, un elemento de ADN orientado antisentido (indicado "ADN a/s"), un elemento de ADN orientado sentido complementario (indicado "ADN s") y ADN que proporciona señales y sitio de poliadenilación (indicado "sitio poliA"). La construcción de ADN se transcribe a ARN que comprende un segmento de ARN orientado antisentido y un segmento de ARN complementario que es complementario al extremo más 5' del segmento de ARN orientado antisentido. Los extremos 5' y 3' del ARN antisentido puede auto hibridarse para formar un segmento de ARN de doble cadena que cierra un bucle de ARN orientado antisentido. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos del extremo más 5' de la cadena de ADN orientado antisentido transcrito es 5'-CGGCATA---, la secuencia del extremo más 3' de la cadena transcrita del ADN de repetición invertida será ---TATGCCG-3' que se clona fácilmente del ADN fuente que proporciona el elemento antisentido. Con tales secuencias el bucle del ARN orientado antisentido se prolongará a partir de un lado de un segmento de ARNdc, por ejemplo,

5' -GCCGUAU-----

3' -CGGCAUA-----

45 El ADN orientado antisentido y su ADN autocomplementario puede ser contiguo o estar separado por ADN vector, por ejemplo, hasta aproximadamente 100 nucleótidos o así de ADN vector separando los sitios de restricción usados para el ensamblaje del vector.

50 Las construcciones de ADN recombinante se pueden ensamblar usando materiales y procedimientos comercialmente disponibles conocidos por aquellos con un conocimiento normal en la técnica. Una tecnología útil para construir construcciones de ADN y vectores para la transformación es la tecnología de clonación GATEWAY™ (disponible de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California) que usa la reacción de clonación de la LR recombinasa específica a sitio del sistema de Integrasa *att* de la construcción de vector del bacteriófago lambda, en lugar de endonucleasas y ligasas de restricción. La reacción de clonación de LR se describe en los documentos de patente americana 5.888.732 y 6.277.608, las Publicaciones de Solicitud de Patente americana 2001283529, 2001282319 y 20020007051.

55 El Manual de Instrucción de la Tecnología de Clonación de GATEWAY™ el cual también está suministrado por Invitrogen también proporciona direcciones concisas para la clonación rutinaria de cualquier ADN deseado en un vector que comprende elementos de expresión vegetal operables.

Un procedimiento de fabricación de vector alternativo emplea la clonación independiente a ligación descrita por Aslanidis, C. y col., *Nucleic Acids Res.*, 18, 6.069-6.074, 1990 y Rashtchian, A. y col., *Biochem.*, 206, 91-97, 1992 en la que un fragmento de ADN con extremos 5' y 3' de cadena sencilla se ligan en un vector deseado que, a continuación, se pueden amplificar *in vivo*.

5 En la bibliografía se han descrito numerosos promotores que están activos en células vegetales. Estos incluyen promotores presentes en genomas vegetales, así como promotores de otras fuentes, incluyendo el promotor de nopalina sintasa (nos) y promotores de octopina sintasa (ocs) portados sobre plásmidos inductores de tumor de *Agrobacterium tumefaciens*, promotores de caulimovirus tales como el virus del mosaico de la coliflor o promotores del virus del mosaico de escrofularia (*figwort*). Por ejemplo, véase los documentos de patente americana 5.322.938 y  
10 5.858.742 que describen versiones del promotor constitutivo derivado del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S), el documento de patente americana 5.378.619 que describe un promotor 35S del Virus del Mosaico de escrofularia (FMV), el documento de patente americana 5.420.034 que describe un promotor de napina, el documento de patente americana 6.437.217 que describe un promotor RS81 de maíz, el documento de patente americana 5.641.876 que describe un promotor de actina de arroz, el documento de patente americana 6.426.446 que describe un promotor  
15 RS324 de maíz, el documento de patente americana 6.429.362 que describe un promotor PR-1 de maíz, el documento de patente americana 6.232.526 que describe un promotor A3 de maíz, el documento de patente americana 6.177.611 que describe promotores de maíz constitutivos, el documento de patente americana 6.433.252 que describe un promotor de oleosina L3 de maíz, el documento de patente americana 6.429.357 que describe un promotor e intrón de actina 2 de arroz, el documento de patente americana 5.837.848 que describe un promotor específico de raíz, el documento de patente americana 6.084.089 que describe promotores inducibles por frío, el  
20 documento de patente americana 6.294.714 que describe promotores inducibles por luz, el documento de patente americana 6.140.078 que describe promotores inducibles por sal, el documento de patente americana 6.252.138 que describe promotores inducibles por patógeno, el documento de patente americana 6.175.060 que describe promotores inducibles por deficiencia de fósforo, el documento de patente americana 6.635.806 que describe un promotor de coixina, el documento U.S. 2002/0192813A1 que describe los elementos 5', 3' e intrón útiles en el  
25 diseño de vectores de expresión vegetal eficaces, el documento U.S. 2004/0216189A1 que describe un promotor de aldolasa de cloroplasto de maíz, y el documento U.S. 2004/01233447A1 que describe promotores inducibles por déficit de agua.

Estos y numerosos otros promotores que funcionan en células vegetales son conocidos por los expertos en la técnica y están disponibles para su uso en polinucleótidos recombinantes de la presente invención para proporcionar la expresión de genes deseados en células de planta transgénica.

Además, los promotores se pueden alterar para contener "secuencias potenciadoras" múltiples para ayudar en la elevación de la expresión génica. Tales potenciadores son conocidos en la técnica. Al incluir una secuencia potenciadora con tales construcciones, se puede aumentar la expresión de la proteína seleccionada. Estos  
35 potenciadores con frecuencia se encuentran 5' al inicio de la transcripción en un promotor que funciona en células eucariotas, pero con frecuencia pueden estar insertados corriente arriba (5') o corriente abajo (3') a la secuencia codificadora. En algunos casos, estos elementos potenciadores 5' son intrones. Particularmente útil como potenciadores son los intrones 5' de los genes de la actina 1 de arroz (véase el documento de patente americana 5.641.876) y actina 2 de arroz, el intrón del gen de la alcohol deshidrogenasa de maíz, el intrón del gen de la proteína de choque térmico 70 de maíz (documento de patente americana 5.593.874) y el gen shrunken 1 de maíz. Se desea suficiente expresión en tejidos de semilla de planta para efectuar mejoramientos en la composición de la semilla. Promotores ilustrativos para su uso para la modificación de la composición de semilla incluyen promotores de genes de semilla tales como napina (documento U.S. 5.420.034), L3 oleosina de maíz (documento U.S. 6.433.252), zeina Z27 (Russell y col. (1997) *Transgenic Res.* 6(2):157-166), globulina 1 (Belanger y col. (1991) *Genetics* 129:863-872), glutelina 1 (Russell (1997) *supra*), y peroxirredoxina antioxidante (Perl) (Stacy y col. (1996) *Plant Mol. Biol.* 31(6):1.205-1.216).

Las construcciones de ADN recombinante con frecuencia incluirán un elemento 3' que contiene generalmente una señal y un sitio de poliadenilación, especialmente si el ADN recombinante está dirigido a la expresión de proteína, así como la supresión génica. Elementos 3' bien conocidos incluyen aquellos de genes de *Agrobacterium tumefaciens* tales como *nos 3'*, *tml 3'*, *tmr 3'*, *tms 3'*; *ocs 3'*, *tr7 3'*, por ejemplo, descritos en el documento U.S. 6.090.627; elementos 3' de genes vegetales tales como proteína de choque térmico 17 de trigo (*Triticum aestivum*), un gen de ubiquitina de trigo, un gen de fructosa-1,6-bifosfatasa de trigo, un gen de glutelina de arroz, un gen de lactato deshidrogenasa de arroz y un gen de beta-tubulina de arroz, todos los cuales están descritos en la solicitud de patente publicada americana 2002/0192813 A1; y el gen de la ribulosa bifosfato carboxilasa de guisante (*Pisum sativum*) (*rbs 3'*), y elementos 3' de los genes dentro de la planta hospedadora.

Las construcciones de ADN recombinante de supresión génica también se pueden apilar con ADN que imparte otros rasgos de interés agronómico que incluye ADN que proporciona resistencia a herbicida o resistencia a insecto tal como usando un gen de *Bacillus thuringiensis* para proporcionar resistencia frente a lepidópteros, coleópteros, homópteros, hemípteros y otros insectos. Herbicidas para los cuales la resistencia es útil en una planta incluyen herbicidas de glifosato, herbicidas de fosfotricina, herbicidas de oxinilo, herbicidas de imidazolinona, herbicidas de dinitroanilina, herbicidas de piridina, herbicidas de sulfonilurea, herbicidas de bialafos, herbicidas de sulfonamida y herbicidas de glufosinato. Personas de conocimiento normal en la técnica son capaces de proporcionar rasgos

apilados en referencia a las publicaciones de solicitud de patente americana 2003/0106096A1 y 2002/0112260A1 y documentos de patente americana 5.034.322; 5.776.760; 6.107.549 y 6.376.754 y a resistencia a insecto/nematodo/virus en referencia a los documentos de patente americana 5.250.515; 5.880.275; 6.506.599; 5.986.175 y la Publicación de Solicitud de Patente americana 2003/0150017 A1. **Procedimientos de**

5 **transformación** – Se conocen numerosos procedimientos para la transformación células vegetales con ADN recombinante en la técnica y se pueden usar en la presente invención. Dos procedimientos frecuentemente usados para la transformación de planta son transformación mediada por *Agrobacterium* y bombardeo con microproyectiles. Los procedimientos de bombardeo con microproyectiles están ilustrados en los documentos de Patente americana 5.015.580 (soja); 5.550.318 (maíz); 5.538.880 (maíz); 5.914.451 (soja); 6.160.208 (maíz); 6.399.861 (maíz) y 10 6.153.812 (trigo) y la transformación mediada por *Agrobacterium* está descrita en los documentos de patente americana 5.159.135 (algodón); 5.824.877 (soja); 5.591.616 (maíz); y 6.384.301 (soja).

Para el sistema de transformación de planta basado en *Agrobacterium tumefaciens*, elementos adicionales presentes sobre las construcciones de transformación incluirán secuencias del borde izquierdo y derecho de ADN-T para facilitar la incorporación del polinucleótido recombinante en el genoma vegetal.

15 En general es útil introducir ADN recombinante al azar, es decir, a una localización no específica, en el genoma de una línea de planta diana. En casos especiales puede ser útil para dirigir la inserción de ADN recombinante para conseguir la integración específica a sitio, por ejemplo, para reemplazar un gen existente en el genoma, para usar un promotor existente en el genoma vegetal, o para insertar un polinucleótido recombinante en un sitio predeterminado conocido por ser activo para la supresión génica. Varios sistemas de recombinación específica a 20 sitio que persisten que se sabe que funcionan implantes incluyen cre-lox como se describe en el documento de patente americana 4.959.317 y FLP-FRT como se describe en el documento de patente americana 5.527.695.

Los procedimientos de transformación preferiblemente se practican en el cultivo de tejido sobre medios en un ambiente controlado. Los “medios” se refieren a las numerosas mezclas de nutriente que se usan para cultivar células *in vitro*, es decir, fuera del organismo vivo intacto. Las dianas celulares receptoras incluyen, pero no se 25 limitan a, células de meristemo, callo, embriones inmaduros y células gaméticas tales como microsporas, polen, esperma y óvulos. Se contempló que cualquier célula de la cual se puede regenerar una planta fértil es útil como célula receptora. El callo se puede iniciar a partir de fuentes tisulares que incluyen, pero no se limitan a, embriones inmaduros, meristemas apicales de plantón, microsporas y similares. Células capaces de proliferar como callo también son células receptoras para la transformación genética. Procedimientos de transformación prácticos y 30 materiales para la producción de plantas transgénicas, por ejemplo, diversos medios y células diana receptoras, transformación de embriones inmaduros y posterior regeneración de plantas transgénicas fértiles se describen en los documentos de patente americana 6.194.636 y 6.232.526.

Las semillas de las plantas transgénicas se pueden recolectar de plantas transgénicas fértiles y se usan para cultivar generaciones progenie de plantas transformadas incluyendo, la línea de plantas híbridas para el cribado de plantas 35 que tienen un rasgo agronómico aumentado. Además de transformación directa de una planta con un ADN recombinante, se pueden preparar plantas transgénicas cruzando una primera planta que tiene un ADN recombinante con una segunda planta que carece del ADN. Por ejemplo, el ADN recombinante se puede introducir en la primera línea de planta que está disponible para la transformación para producir una planta transgénica que se puede cruzar con una segunda línea de planta para someter a introgresión el ADN recombinante en la segunda línea 40 de planta. Una planta transgénica con ADN recombinante que proporciona un rasgo agronómico aumentado, por ejemplo, producción aumentada, se puede cruzar con la línea de planta transgénica que tiene otro ADN recombinante que confiere otro rasgo, por ejemplo, resistencia a herbicida o resistencia a plaga, para producir plantas progenie que tienen ADN recombinante que confiere ambos rasgos. Generalmente, en dicho cultivo para combinar rasgos la planta transgénica que dona el rasgo adicional es una línea masculina y la planta transgénica 45 que porta los rasgos base es la línea femenina. La progenie de este cruce se segregará de manera que algunas de las plantas portarán el ADN para ambos rasgos parentales y algunos portarán ADN para un rasgo parental; tales plantas se pueden identificar por marcadores asociados con plantas progenie de ADN recombinante parental que portan ADN para ambos rasgos parentales se pueden cruzar de nuevo en la línea madre femenina múltiple veces, por ejemplo, normalmente 6 a 8 generaciones, para producir una planta progenie con básicamente el mismo 50 genotipo que una línea parental transgénica original pero para el ADN recombinante de la otra línea parental transgénica.

En la práctica de la transformación el ADN generalmente se introduce dentro de solamente un pequeño porcentaje de células diana en un experimento cualquiera de transformación. Se usaron genes marcadores para proporcionar un sistema eficaz para la identificación de aquellas células que se transforman de manera estable recibiendo e 55 integrando una construcción de ADN transgénica dentro de sus genomas. Los genes marcadores preferidos proporcionan marcadores selectivos que confieren resistencia a un agente selectivo, tal como un antibiótico o herbicida. Cualquiera de los herbicidas a los cuales las plantas pueden ser resistentes son agentes útiles para marcadores selectivos. Se exponen células potencialmente transformadas al agente selectivo. En la población de células supervivientes serán aquellas células en las que, generalmente, el gen que confiere resistencia está 60 integrado y se expresa a niveles suficientes para permitir la supervivencia de la célula. Las células se pueden ensayar más para confirmar la integración estable del ADN exógeno. Genes marcadores selectivos frecuentemente usados incluyen aquellos que confieren resistencia a antibióticos tales como kanamicina y paromomicina (*nptII*),

higromicina B (*aph IV*) y gentamicina (*aac3* y *aacC4*) o resistencia a herbicidas tales como glufosinato (*bar* o *pat*) y glifosato (*aroA* o EPSPS). Ejemplos de tal marcador genético se ilustran en los documentos de patente americana 5.550.318; 5.633.435; 5.780.708 y 6.118.047.

- 5 También se pueden emplear marcadores que se pueden someter a cribado que proporcionan una capacidad de identificar visualmente transformantes, por ejemplo, un gen que expresa una proteína coloreada o fluorescente tal como una luciferasa o proteína verde fluorescente (GFP) o un gen que expresa una *beta*-glucuronidasa o gen *uidA* (GUS) para los cuales se conocen diversos sustratos cromogénicos.

- 10 Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o células que se han puntuado positivas en un ensayo de cribado, se pueden cultivar en medios de regeneración y dejar que maduren en las plantas. Las plántulas en desarrollo se pueden transferir a mezcla de crecimiento vegetal, y aclimatar, por ejemplo, en una cámara ambientalmente controlada a una humedad relativa de aproximadamente 85 %, 600 ppm de CO<sub>2</sub> y 25 a 250 microeinsteins m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de luz, antes de transferirse a un invernadero o cámara de cultivo para la maduración. Las plantas se regeneran desde aproximadamente 6 semanas a 10 meses después de que se identifique un transformante, dependiendo del tejido inicial. Las plantas se pueden polinizar usando procedimientos de cultivo vegetal convencionales conocidos por los expertos en la técnica y se produce semilla, por ejemplo, la autopolinización se usa frecuentemente con maíz transgénico. La planta transformada regenerada o su semilla o plantas progenie se puede ensayar para la expresión del ADN recombinante y someter a cribado para la presencia de rasgo agronómico aumentado.

### Plantas y semillas transgénicas

- 20 Se cultivaron semillas de planta transgénica descrita en el presente documento para generar plantas transgénicas que tienen un rasgo aumentado en comparación con una planta control. Tal semilla para plantas con rasgo agronómico aumentado se identifica por cribado de plantas transformadas o semilla progenie para rasgo aumentado. Por eficacia se diseña un programa de cribado para evaluar plantas transgénicas múltiples (eventos) que comprenden el ADN recombinante, por ejemplo, plantas múltiples desde 2 a 20 o más eventos transgénicos.
- 25 Plantas transgénicas cultivadas a partir de semilla transgénica proporcionada en el presente documento demuestran rasgos agronómicos mejorados que contribuyen a producción incrementada u otro rasgo que proporciona valor de planta incrementada, incluyendo, por ejemplo, calidad de semilla mejorada. De particular interés son las plantas que tienen producción mejorada que resulta del crecimiento y desarrollo vegetal mejorado, tolerancia al estrés, desarrollo de semilla mejorado, mayor respuesta a la luz, desarrollo de la flor mejorado, o metabolismo del carbono y/o nitrógeno mejorado.

- 30 Muchos eventos transgénicos que sobreviven hasta plantas transgénicas fértiles que producen semillas y plantas progenie no presentará un rasgo agronómico mejorado. El cribado es necesario para identificar la planta transgénica que tiene rasgos agronómicos aumentados a partir de poblaciones de plantas transformadas como se describen en el presente documento mediante evaluación del rasgo en una diversidad de ensayos para detectar un rasgo agronómico aumentado. Estos ensayos también pueden tomar muchas formas, que incluyen, pero se limitan a, análisis para detectar cambios en la composición química, biomasa, propiedades fisiológicas, morfología de la planta.

Los siguientes ejemplos ilustran aspectos descritos en el presente documento.

#### Ejemplo 1

- 40 Este ejemplo ilustra la preparación de un vector de transformación útil para insertar una construcción de ADN recombinante en una planta transgénica para practicar un procedimiento como se describe en el presente documento.

- 45 El gen *LKR/SDH* codifica una preproteína para la lisina cetoglutarato reductasa (LKR) y sacaropina deshidrogenasa (SDH) que son enzimas en una ruta catabólica de lisina. La supresión de *LKR* es patente en la modificación, por ejemplo, incremento, del contenido de lisina. La supresión de *LKR* está afectada por la expresión en una planta de una construcción de ADN recombinante que produce un ARN antisentido estabilizado transcrito a partir de ADN de *LKR* orientado antisentido y ADN de *LKR* orientado sentido que forma un bucle de ARN orientado antisentido.

Se prepara un vector de transformación que comprende dos unidades de transcripción entre los bordes derecho e izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens*. Una unidad de transcripción para un marcador comprendida por:

- 50 (a) ADN de un promotor de actina de arroz e intrón de actina de arroz,  
 (b) ADN de un péptido de tránsito de cloroplasto de EPSPS de *Arabidopsis*  
 (c) ADN de *aroA* de *A. tumefaciens* (un marcador resistente a glifosato), y  
 (d) ADN de terminador de *NOS* de *A. tumefaciens*,

La otra unidad de transcripción para la supresión del gen *LKR* comprendida por:

- 55 (a) ADN del promotor de *GLB1* de *Zea mays*,

- (b) ADN de un intrón de *ADH1* de *Zea mays*,
- (c) fragmento de ADN orientado antisentido de *LKR* de *Zea mays*,
- (d) fragmento de ADN orientado sentido de *LKR* de *Zea mays*, y
- (e) ADN del terminador de *GLB1* de *Zea mays*.

5 La SEQ ID NO:1 es una secuencia de ADN de un vector de transformación que comprende el marcador anteriormente descrito y los elementos de supresión génica. Véase la Tabla 1 de a continuación para una descripción de los elementos del vector de transformación contenido dentro de la SEQ ID NO:1.

Tabla 1

Bases de SEQ ID NO:1	Descripción del segmento de ADN
1-357	borde derecho de <i>A. tumefaciens</i>
376-1774	ADN de un promotor de actina de arroz e intrón de actina de arroz
1784-2011	ADN del péptido de tránsito de cloroplasto de EPSPS de <i>A. tumefaciens</i>
2012-3379	ADN de <i>A. tumefaciens aroA</i> (marcador resistente a glifosato)
3395-3647	ADN del terminador de <i>NOS</i> de <i>A. tumefaciens</i>
3691-4686	ADN del terminador de <i>GIB1</i> de <i>Zea mays</i>
4692-5145	Elemento de ADN orientado sentido de <i>LKR</i> de <i>Zea mays</i>
5152-6118	Elemento de ADN orientado antisentido de <i>LKR</i> de <i>Zea mays</i>
6123-6680	ADN de un intrón de <i>ADH1</i> de <i>Zea mays</i>
6687-8082	ADN del promotor de <i>GLB1</i> de <i>Zea mays</i>
8149-8590	borde izquierdo de <i>A. tumefaciens</i>

10 Se usó un vector preparado con los elementos enumerados en la Tabla 1 para transformar tejido vegetal de maíz. Se obtuvieron plantas de maíz transgénicas por transformación mediada por *Agrobacterium*. Las plantas transgénicas a partir de dos eventos de inserción transgénica separados se cultivaron para producir semilla F1. Seis semillas maduras de cada evento se analizaron para determinar el éxito de la transformación y supresión de *LKR*.  
 15 Las semillas transgénicas maduras se diseccionaron para extraer la proteína que se analizó por análisis tipo Western. Con referencia a la Figura 2, la semilla de uno de los eventos no mostró reducción en *LKR* en comparación con el tipo silvestre; y se mostró que la semilla del otro evento se segregaba (1:1 hemicigoto:tipo silvestre) ya que tres de las seis semillas mostraron reducción sustancial en *LKR* en comparación con el tipo silvestre.

### Ejemplo 2

20 Este ejemplo ilustra vectores de transformación útiles para insertar una construcción de ADN recombinante en una planta transgénica para practicar un procedimiento como se describe en el presente documento. Se prepararon vectores de transformación usando los siguientes elementos de ADN en los que:

- (a) "pGcx" se refiere a ADN para un promotor derivado de un gen de gama coixina de *Coix lacryma-jobi*;
- (b) "pZ27" se refiere a ADN para un promotor derivado de un gen de gama zeina de *Zea mays*;
- (c) "pZ27t" se refiere a ADN para un promotor truncado que tiene secuencia líder de 59 nucleótidos sometida a  
 25 delección de la región 3' de pZ27;
- (d) "Z19as" se refiere a ADN para un segmento orientado antisentido de 351 nucleótidos de la secuencia codificadora de un gen de alfa zeina de 19 kilo daltons de *Zea mays*;
- (e) "Z19s" se refiere a ADN para un segmento orientado sentido de 351 nucleótidos de la secuencia codificadora de un gen de alfa zeina de 19 kilo daltons de *Zea mays*, que es una repetición invertida de Z19as;
- (f) "Z22as" se refiere a ADN para un segmento orientado antisentido de 789 nucleótidos de la secuencia  
 30 codificadora de un gen de alfa zeina de 22 kilo daltons de *Zea mays*;
- (g) "Z22asL" se refiere a ADN para un segmento orientado antisentido de 785 nucleótidos de la secuencia codificadora de un gen de alfa zeina de 22 kilo daltons de *Zea mays*;
- (h) "Z22asSI" se refiere a ADN para un segmento orientado antisentido de 789 nucleótidos de la secuencia  
 35 codificadora de un gen de alfa zeina de 22 kilo daltons de *Zea mays* que tiene un intrón capaz de ser sometido a corte y empalme de 520 nucleótidos de longitud de un intrón 3 del gen GB1 de *Zea mays* insertado en la región no emparejada;
- (i) "Z22s" se refiere a ADN para un segmento orientado sentido de 289 nucleótidos de la secuencia codificadora

de un gen de alfa zeína de 22 kilo daltons de *Zea mays*, el cual es una repetición invertida del extremo 5' de Z22as; y

(j) "TE9" se refiere a ADN para un elemento de señal y sitio de poliadenilación orientada sentido de un gen *RbcS2* de *Pisum sativum*

- 5 Con referencia a la Tabla 2 y la SEQ ID NO: 2 se produjo un vector de transformación que comprendía la "construcción 2a" de la manera del Ejemplo 1 excepto que la unidad de transcripción para la supresión del gen LKR se reemplazó por una unidad de transcripción que comprendía los elementos ilustrados en el siguiente esquema: "Construcción 2a" pZ27 - Z19as - Z22asL - Z22s - Z19s - TE9

Tabla 2

Bases de SEQ ID NO:2	Descripción de segmento de ADN
1-357	borde derecho de <i>A. tumefaciens</i>
376-1774	ADN de un promotor de actina de arroz e intrón de actina de arroz
1784-2011	ADN de péptido de tránsito de cloroplasto de EPSPS de <i>A. tumefaciens</i>
2012-3379	ADN de <i>A. tumefaciens aroA</i> (marcador resistente a glifosato)
3395-3647	ADN del terminador de NOS de <i>A. tumefaciens</i>
3479-4391	ADN del terminador de <i>RbcS2</i> de <i>Pisum sativum</i>
4398-4748	ADN para Z19s
4755-5043	ADN para Z22s
5050-5835	ADN de Z22asL
5842-6192	ADN de Z19as
6204-7305	ADN del promotor Z27 de <i>Zea mays</i>
7353-7794	borde izquierdo de <i>A. tumefaciens</i>

10

Se transformó callo de maíz y se seleccionaron eventos con una copia sencilla del vector de transformación para el desarrollo en plantas. La semilla de plantas cultivadas a partir de 26 de 29 eventos de copia sencilla mostró considerable reducción de las alfa zeínas de 19 kilo daltons y las alfa zeínas de 22 kilo daltons.

- 15 Se produjeron otros vectores de transformación de una manera similar usando los elementos ilustrados en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3

Construcción 2b1	pGcx - Z19as - Z22asSI - Z22s - Z19s - TE9
Construcción 2b2*	pGcx - Z19as - Z22asSI - Z22s - Z19s - TE9
Construcción 2c	pZ27 - Z19as - Z22asSI - Z22s - Z19s - TE9
Construcción 2d	PZ27t - Z19as - Z22asSI - Z22s - Z19s - TE9
Construcción 2e	PZ27 - Z19as - Z22asL - Z19s - TE9
* la construcción 2b2 se insertó en un vector de transformación que también incluía una unidad de transcripción para la expresión de otro gen que tenía un promotor contiguo a pGcx.	

- 20 Se informa de la eficacia de supresión de las alfa zeínas en semillas producidas por plantas cultivadas a partir de eventos de copia sencilla en la Tabla 4 la cual informa del número de eventos transgénicos con reducción de zeínas en comparación con el número total de eventos transgénicos generados en cada construcción ensayada. El fenotipo de reducción de zeína es observado por análisis de MALDITOF MS (Espectrometría de masas con tiempo de vuelo de ionización por desorción por láser asistida por matriz). La Figura 3 ilustra espectros típicos que evidencian la reducción de zeína.

Tabla 4

Construcción	zeina 19 kD	zeina 19 y 22 kD
2a	26/29	26/29
2b1	0/21	0/21
2b2	5/7	0/7
2c	20/21	18/21
2d	7/8	1/8
2e	12/14	2/14

**Listado de secuencias**

- 5 <110> Malvar, Thomas  
 <110> Huang, Shihshieh  
 <110> Luethy, Michael
- <120> ADN recombinante para supresión génica
- 10 <130> 38-15 (53428)B
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.2
- 15 <210> 1  
 <211> 8590  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 20 <220>  
 <223> construcción de ADN recombinante en plásmido entre bordes de *Agrobacterium*
- 25 <400> 1



ES 2 645 298 T3

cgtctcgcag ccaaaaaaaaa aaagaaagaa aaaaaagaaa aagaaaaaac agcaggtggg 1080  
 tccgggtcgt gggggccgga aacgcgagga ggatcgcgag ccagcgcgca ggccggccct 1140  
 ccctccgctt ccaaagaaac gccccccatc gccactatat acataccccc cctctcctc 1200  
 ccatccccc aaccctacca ccaccaccac caccacctcc acctcctccc cctcgcctgc 1260  
 eggacgacga gctcctcccc cctccccctc cgccgcccgc gcgccggtaa ccaccccgcc 1320  
 cctctcctct ttctttctcc gttttttttt ccgtctcggg etcgatcttt ggccctggta 1380  
 gtttgggtgg gcgagaggcg gcttcgtgcg cgcgccagatc ggtgcgcggg aggggcccga 1440  
 tctcgcggct ggggctctcg ccggcgtgga tccggcccgg atctcgcggg gaatggggct 1500  
 ctcggatgta gatctgcgat ccgccgttgt tgggggagat gatggggggg ttaaaatttc 1560  
 cgccgtgcta aacaagatca ggaagagggg aaaagggcac tatggtttat atttttatat 1620  
 atttctgctg cttegtcagg cttagatgtg ctagatcttt cttctctctt tttgtgggta 1680  
 gaatttgaat ccctcagcat tgttcacgcg tagtttttct tttcatgatt tgtgacaaat 1740  
 gcagcctcgt ggggagcttt tttgtaggta gaagtgatca accatggcgc aagttagcag 1800  
 aatctgcaat ggtgtgcaga acccatctct tatctccaat ctctcgaaat ccagtcaacg 1860  
 caaatctccc ttatcggttt ctctgaagac gcagcagcat ccacgagctt atccgatttc 1920  
 gtcgtcgtgg ggattgaaga agagtgggat gacgttaatt ggctctgagc ttcgtcctct 1980  
 taaggatcatg tcttctgttt ccacggcgtg catgcttcac ggtgcaagca gccggcccgc 2040  
 aaccgcccgc aaatcctctg gcctttccgg aaccgtccgc attcccggcg acaagtcgat 2100  
 ctcccacggg tcttcatgt tcggcggctc cgcgagcggg gaaacgcgca tcaccggcct 2160  
 tctggaaggc gaggacgtca tcaatacggg caaggccatg caggcgatgg gcgcccgcat 2220  
 ccgtaaggaa ggcgacacct ggatcatcga tggcgtcggc aatggcggcc tctggcgcc 2280  
 tgaggcgccg ctcgatttcg gcaatgccgc cacgggctgc cgctgacga tgggctcgt 2340  
 cggggtctac gatttcgaca gcacctcat cggcgacgcc tcgctcacia agcgcctgat 2400  
 gggccgcgtg ttgaaccgc tgccgaaat gggcgtgcag gtgaaatcgg aagacgggta 2460  
 ccgtcttccc gttaccttgc gcgggcgaa gacgccgacg ccgatcacct accgcgtgcc 2520  
 gatggcctcc gcacaggtga agtccgccgt gctgctcgc gccctcaaca cgcccggcat 2580  
 cacgacggtc atcgagccga tcatgacgcg cgatcatacg gaaaagatgc tgcagggctt 2640  
 tggcgccaac cttaccgtcg agacggatgc ggacggcgtg cgcaccatcc gcctggaagg 2700

ES 2 645 298 T3

ccgcggaag ctcaccggcc aagtcacga cgtgccgggc gaccgcctct cgacggcctt 2760  
 cccgctgggt ggggcoctgc ttgttcggg ctcgcagcgc accatcctca acgtgctgat 2820  
 gaaccccacc cgcaccggcc tcacctctgac gctgcaggaa atggggcgccg acatcgaagt 2880  
 catcaaccgg cgccttgccg ggggcaaga cgtggcggac ctgcgcgttc gctcctccac 2940  
 gctgaagggc gtcacgggtc cggaagaccg cgcgccttcg atgatcgacg aatatccgat 3000  
 tctcgtctgc gccgcccctc tcgcggaagg ggcgaccgtg atgaacggtc tggaagaact 3060  
 ccgctcaag gaaagcgacc gcctctcggc cgtcgccaat ggctcaagc tcaatggcgt 3120  
 ggattgcgat gagggcgaga cgtcgcctct cgtgcgtggc cgcctcgacg gcaaggggct 3180  
 cggcaacgcc tcgggcgcgc ccgtcgccac ccacctcgat caccgcctcg ccatgagctt 3240  
 cctcgtcatg ggctcgtgt cggaacccc tgtcaagggt gacgatgcca cgatgatcgc 3300  
 caagagcttc ccggagttca tggacctgat ggcgggctg ggcgcgaaga tcgaactctc 3360  
 cgatacgaag gctgcctgat gagctcgaat tcccgatcgt tcaaacattt ggcaataaag 3420  
 tttcttaaga ttgaatcctg ttgcgggtct tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa 3480  
 ttaagtttag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg ttatttatga gatggggttt 3540  
 tatgattaga gtcccgaat tacaattta atacgcgata gaaaacaaaa tatagcgcgc 3600  
 aaactaggat aaattatcgc gcgcgggtgc atctatgtta ctagatcggg gatgggggat 3660  
 ccaactagtg tatccgtcga gtggcggcgc cgttttatga ataataataa tgcatactctg 3720  
 tgcattacta cctgggatac aagggtctct ccgccataac aaattgagtt gcgatgctga 3780  
 gaacgaacgg ggaagaaagt aagcgcgcc caaaaaaaaac gaacatgtac gtcggctata 3840  
 gcaggtgaaa gttcgtgcgc caatgaaaag ggaacgatat gcggtgggta gttgggatac 3900  
 ttaaatttgg agagtttgtt gcatacacta atccactaaa gttgtctatc tttttaacag 3960  
 ctctaggcag gatataagat ttatatctaa tctgttgag ttgcttttag agtaactttt 4020  
 ctctctgttt cgtttatagc cgattagcac aaaattaaac taggtgacga gaaataaaga 4080  
 aaaacggagg cagtaaaaaa taccaaaaa aatacttggg gatTTTTTgtc tcaaaattat 4140  
 cttctaattt taaaagctac atattaaaaa tactatata taaaaatact tcgagatcat 4200  
 tgcttgggat gggcagggcc aatagcta atgctaaggat gggctatatt tatgtatcgt 4260  
 ctgaaacatg taggggctaa tagttagatg actaatttgc tgtgttcgta cgggggtgctg 4320  
 tttgagccta gcgatgaagg gtcatagttt catacaagaa ctcacttttg gttcgtctgc 4380  
 tgtgtctgtt ctcagcgtaa cggcatcaat ggatgcaaaa ctccgcaagg ggacaaatga 4440

ES 2 645 298 T3

agaagcgaag agattataga acacgcacgt gtcattatth atttatggac ttgcctcagt 4500  
 agcttacagc atcgtacccg cacgtacata ctacagagcc acacttattg cactgcctgc 4560  
 cgcttacgta catagttaac acgcagagag gtatatacat acacgtccaa cgtctccact 4620  
 caggctcatg ctacgtacgc acgtcggteg cgcgccaccc tctcgttgct tectgctcgt 4680  
 tttggcgaat tccgatttgg caagtgttcc agagcaaaag ctggaagctc tcgtagtctg 4740  
 agcctctttg ctgattcata caagttatga ccatctacat ggatcgtctc accaagaaat 4800  
 ttgtagactg caggatthtt cctgaccgg agtgcaccag ctgggttcca actgaattta 4860  
 taggcaagcg gattgthttg tgcagctgga gatggcaatc caccacagta agatgtaaat 4920  
 gcctthattt tcccttttcg tgcattgagct tcatcaatca tcttcattga catcaagtga 4980  
 tctatgccag gatctaggcc catttcacaa agtatagtta cacctgcac tttggcagct 5040  
 tggctcaagt ttgacatgga tcatcaaca tagcttgccg ttaccatgtg cttcttcaac 5100  
 tctatgcata ctcttgcaat ggcagcatga aaactagcag gcagcaccgg ttggacatca 5160  
 ttgagacagc tggaggthca tttcacttgg ttagatgtga agttggacaa agcacggatg 5220  
 atatgtcgta ctacagactt gaagtaggag cagatgatac tgccacattg gataaaatta 5280  
 ttgattcctt gacttcttta gctaatgaac atggtggaga tcacgatgcc gggcaagaaa 5340  
 ttgaattagc tctgaagata ggaaaagtca atgagtatga aactgacgtc acaattgata 5400  
 aaggagggcc aaagatthta attcttggag ctggaagagt ctgtcggcca gctgctgagt 5460  
 tcttggcacc ttaccagac atatgtacct atggtgttga tgaccatgat gcagatcaaa 5520  
 ttcattgtat cgtggcatct ttgtatcaaa aagatgcaga agagacagtt gatggatttg 5580  
 aaaatacaac tgctaccag ctgatgttg ctgatattgg aagcctthca gatcttgttt 5640  
 ctcaggttga ggttgaatt agcttgcctc ctgctagtht tcatgctgcc attgcaggag 5700  
 tatgcataga gttgaagaag cacatggtaa cggcaagcta tgttgatgaa tccatgtcaa 5760  
 acttgagcca agctgcaaaa gatgcaggtg taactatact ttgtgaaatg ggcttagatc 5820  
 ctggcataga tcaactgatg tcaatgaaga tgattgatga agctcatgca cgaaagggaa 5880  
 aaataaaggc atthacatct tactgtggtg gattgccacc tccagctgca gcaaacaatc 5940  
 cgcttgccca taaattcagt tggaaaccag ctggtgcact ccggtcaggg aaaaatcctg 6000  
 cagtctacaa atthcttggg gagacgatcc atgtagatgg tcataacttg tatgaatcag 6060  
 caaagaggct cagactacga gagcttccag cthttgctct ggaacacttg ccaaactcggg 6120

ES 2 645 298 T3

atccgcagct gcacgggtcc aggaaagcaa tcgcatagtc aagctaaatc atcaagatgc 6180  
 aaacttttcg cccttgctaa acacggtaaa attcgaatgg acatgtgtgg agcagcaaag 6240  
 gccttacgtc cgagaaacag ggccactcaa cgagttagtt aaattcaaag aaagaaacgc 6300  
 ctcttgcaa gttgcaacat tottagatca tactgatgaa aatgacgtct ttcattaag 6360  
 aacaggggaag atagatcttt gctcaatatc gtatgatgtg ttcagccaga ctgtcggatg 6420  
 gaccacacgg taatagcagt gctggacgat gttacatcga gaaagattac tagccttttc 6480  
 atgggagtga aggatataaa agaaataagt tcaccacgat tgcaggatag catacaagat 6540  
 cagcgccact ggggcaactgt tcatcgaaaa aaaaactgtg gacgaagcta gctttcccca 6600  
 aaattactca acgaatcata aaccaagatt agtcagatca agagacagag gagaaacaag 6660  
 ggggaccttt gcacttgatc ggatccttgg gttggctgta tgcagaacta aagcggaggt 6720  
 ggcgcgcatt tataccagcg ccggggcctg gtacgtggcg cggccgcgcg gctacgtgga 6780  
 ggaaggctgc gtggcagcag acacacgggt cgccacgtcc cgcctactc tctttaccgt 6840  
 gcttatccgg gctccggctc ggtgcacgcc aggggtgtggc cgcctctgag cagactttgt 6900  
 cgtgttcac agtgggtgctg tgttccgggg actccgatcc ggcgcgagcg accgagcgtg 6960  
 taaaagagtt cctactaggt acgttcattg tatctggacg acgggcagcg gacaatttgc 7020  
 tgtaagagag gggcagtttt tttttagaaa aacagagaat tccgttgagc taattgtaat 7080  
 tcaacaaata agctattagt tggttttagc ttagattaaa gaagctaacg actaatagct 7140  
 aataattagt tggcttatta gttgactcat ttaaggccc tgtttcaatc tcgcgagata 7200  
 aactttagca gctatTTTTT agctactttt agccatttgt aatctaaaca ggagagctaa 7260  
 tggtggtaat tgaaactaaa ctttagcact tcaattcata tagctaaagt ttagcaggaa 7320  
 gctaaacttt atcccgtgag attgaaacgg ggccataatc tctcagctat ttttgatgca 7380  
 aattactgtc actactggaa tcgagcgcctt tgccgagtgt caaagcctga aaaacactcc 7440  
 gtaaagactt tgcctagtgt gacactcgac aaagagatct cgacgaacag tacatcgaca 7500  
 acggcttctt tgtcgagtac tttttatcgg aacttgaca aagtctttgt cgagtgaact 7560  
 acattgaaac tctatgattt tatgtgtagg tcaacttagt ttctacacat agtacgtcac 7620  
 aactttaccg aaacattatc aaatttttat cacaacctct atatatgata tcatgacatg 7680  
 tggacaagtt tcattaattt ctgactttat ttgtgtttta tacaattttt aaacaactag 7740  
 ataacaagtt cacggtcatg tttagtgagc atgggtgcttg aagattctgg tctgcttctg 7800  
 aaatcggtcg taacttgtgc tagataacat gcataatcatt tattttgcat gcacggtttt 7860

ES 2 645 298 T3

ccatgtttcg agtgacttgc agtttaaagtg tgaattttcc gaagaaattc aaataaacga 7920  
actaaatcta atatttatag aaaacatttt tgtaaataatg taattgtgcc aaaatggtac 7980  
atgtagatct acatagtgtg ggaacatacc acaaaaagtt tggttggcaa aataaaaaaa 8040  
ataaaatata ctttatccga gtgtccaagg tatggcactc ggcccgggtg gccaaagctta 8100  
ctagcccggg cgcgccttaa ttaagcggcc gcacgatcg tgaagtttct catctaagcc 8160  
cccatttggg cgtgaatgta gacacgtcga aataaagatt tccgaattag aataatttgt 8220  
ttattgcttt cgcctataaa tacgacggat cgtaatttgt cgttttatca aaatgtactt 8280  
tcattttata ataacgctgc ggacatctac atttttgaat tgaaaaaaaa ttggtaatta 8340  
ctctttcttt ttctccatat tgaccatcat actcattgct gatccatgta gatttccggg 8400  
acatgaagcc atttacaatt gaatatatcc tgccgcccgt gccgctttgc acccgggtgga 8460  
gottgcatgt tggttttctac gcagaactga gccgggttagg cagataatth ccattgagaa 8520  
ctgagccatg tgcacottcc ccccaacacg gtgagcgcag gggcaacgga gtgatccaca 8580  
tgggactttt 8590

<210> 2  
<211> 7794  
<212> ADN  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> construcción de ADN recombinante en plásmido entre bordes de *Agrobacterium*

10

<400> 2

aggatttttc ggcgctgcgc tacgtccgcg accgcgttga gggatcaagc cacagcagcc 60  
cactcgacct tctagccgac ccagacgagc caagggatct ttttggaatg ctgctccgtc 120  
gtcaggcttt ccgacgtttg ggtgggtgaa cagaagtcac tatcgcacgg aatgccaaagc 180  
actcccagag ggaaccctgt ggttggcatg cacatacaaa tggacgaacg gataaacctt 240  
ttcacgccct tttaaatata cgattattct aataaacgct cttttctctt aggtttacc 300  
gccaatatat cctgtcaaac actgatagtt taaactgaag gcgggaaacg acaatctgat 360  
ccccatcaag ctactcagag gtcattcata tgcttgagaa gagagtcggg atagtccaaa 420  
ataaaacaaa ggtaagatta cctgggtcaaa agtgaaaaca tcagttaaaa ggtggtataa 480  
agtaaaatat cgtaataaaa aggtggccca aagtgaatt tactcttttc tactattata 540  
aaaattgagg atgtttttgt cggctactttg atacgtcatt tttgtatgaa ttggttttta 600

ES 2 645 298 T3

agtttattcg cttttggaaa tgcataatctg tatttgagtc gggttttaag ttcgtttgct 660  
 tttgtaaata cagaggggatt tgtataagaa atatctttag aaaaacccat atgctaattt 720  
 gacataattt ttgagaaaaa tatatatcca ggcgaattct cacaatgaac aataataaga 780  
 ttaaaatagc tttcccccg tgcagcgcac ggggtattttt tctagtaaaa ataaaagata 840  
 aacttagact caaaacattt acaaaaacaa ccctaaagt tcctaaagcc caaagtgcga 900  
 tccacgatcc atagcaagcc cagcccaacc caaccaacc caaccaccc cagtccagcc 960  
 aactggacaa tagtctccac accccccac tatcaccgtg agttgtccgc acgcaccgca 1020  
 cgtctcgcag ccaaaaaaaaa aaagaaagaa aaaaaagaaa aagaaaaaac agcaggtggg 1080  
 tccgggtcgt gggggccgga aacgcgagga ggatcgcgag ccagcgcgca ggccggccct 1140  
 ccctcgcctt ccaaagaaac gcccccatc gccactatat acatacccc cctctctctc 1200  
 ccatcccccc aaccctacca ccaccaccac caccacctcc acctctccc ccctcgcctc 1260  
 cggacgcgca gctcctcccc cctccccctc cgcgcgcgcc gcgcggtaa ccacccgcc 1320  
 cctctctctt ttctttctcc gttttttttt cegtctcggg ctcgatcttt ggccctggta 1380  
 gtttgggtgg gcgagaggcg gcttcgtgcg cgcacagatc ggtgcgcggg aggggcggga 1440  
 tctcgcggct ggggctctcg ccggcgtgga tccggcccgg atctcgcggg gaatggggct 1500  
 ctccgatgta gatctgcgat ccgcgcttgt tgggggagat gatggggggg ttaaaatttc 1560  
 cgcctgccta aacaagatca ggaagagggg aaaagggcac tatggtttat atttttatat 1620  
 atttctgctg ctctcgcagg cttagatgtg ctagatcttt cttctctctt tttgtgggta 1680  
 gaatttgaat ccctcagcat tgttcacggt tagtttttct tttcatgatt tgtgacaaat 1740  
 gcagcctcgt gcggagcttt tttgtaggta gaagtgatca accatggcgc aagttagcag 1800  
 aatctgcaat ggtgtgcaga acccatctct tatctccaat ctctcgaat ccagtcaacg 1860  
 caaatctccc ttatcgggtt ctctgaagac gcagcagcat ccacgagctt atccgatctc 1920  
 gtcgtcgtgg ggattgaaga agagtgggat gacgttaatt ggctctgagc ttctctctct 1980  
 taaggatcatg tcttctgttt ccacggcgtg catgcttcac ggtgcaagca gccggcccgc 2040  
 aaccgcccgc aaatctctct gcctttccgg aaccgtccgc attcccggcg acaagtcgat 2100  
 ctcccacggg tcttctcatgt tcggcggctc cgcgagcggg gaaacgcgca tcaccggcct 2160  
 tctggaaggc gaggacgtca tcaatcggg caaggccatg caggcagatg gcgcccgcac 2220  
 ccgtaaggaa ggcgacacct ggatcatcga tggcgtcggc aatggcggcc tctggcgccc 2280

ES 2 645 298 T3

tgaggcgccg ctcgatttcg gcaatgccgc cacgggctgc cgcctgacga tgggcctcgt 2340  
 cggggtctac gatttcgaca gcaccttcat cggcgacgcc tcgctcacia agcgcccgat 2400  
 gggccgcgtg ttgaaccgcg tgcgcgaaat gggcgctgcag gtgaaatogg aagacgggtga 2460  
 ccgtcttccc gttaccttgc gcgggcccga gacgccgacg ccgatcacct accgcgtgcc 2520  
 gatggcctcc gcacaggtga agtccgccgt gctgctcgcc ggcctcaaca cgcccggcat 2580  
 cacgacggtc atcgagccga tcatgacgcg cgatcatacg gaaaagatgc tgcagggctt 2640  
 tggcgccaac cttaccgtcg agacggatgc ggacggcgtg cgcaccatcc gcctggaagg 2700  
 ccgcggaag ctcaccggcc aagtcatcga cgtgccgggc gaccctcctt cgacggcctt 2760  
 cccgctggtt gcggccctgc ttgttccggg ctccgacgtc accatcctca acgtgctgat 2820  
 gaaccccacc cgcaccggcc tcatcctgac gctgcaggaa atgggcgccg acatcgaagt 2880  
 catcaaccgg cgccttgccg gcggcgaaga cgtggcggac ctgcgcgttc gctcctccac 2940  
 gctgaagggc gtcacgggtc cggaagaccg cgcgccttcg atgatcgacg aatatccgat 3000  
 tctcgctgtc gccgcccctt tcgcggaagg ggcgaccgtg atgaacggtc tggagaact 3060  
 ccgctcaag gaaagcgacc gcctctcggc cgtcgccaat ggcctcaagc tcaatggcgt 3120  
 ggattgcgat gagggcgaga cgtcgctcgt cgtgcgtggc cgcctgacg gcaaggggct 3180  
 cggcaacgcc tcgggcccgg ccgtcgccac ccatctcgat caccgcatcg ccatgagctt 3240  
 cctcgtcatg ggctcgtgtt cggaaaacc tgtcacgggtg gacgatgcca cgatgatcgc 3300  
 cacgagcttc ccggagttca tggacctgat ggccgggctg ggcgcgaaga tcgaactctc 3360  
 cgatacgaag gctgcctgat gagctcgaat tcccgatcgt tcaaacattt ggcaataaag 3420  
 tttcttaaga ttgaatcctg ttgccgtctt tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa 3480  
 ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg ttatttatga gatggggttt 3540  
 tatgattaga gtcccgcaat tatacattta atacgcgata gaaaacaaaa tatagcgcgc 3600  
 aaactaggat aaattatcgc gcgcgggtgc atctatgtta ctagatcggg gatgggggat 3660  
 ccactagtga tatccgtcga ctggtacctt cgcgtagcta gcccgggcgc gccttaatta 3720  
 agcggccgct tcgagtggtt gcaggtcgat tgatgcatgt tgtcaatcaa ttggcaagtc 3780  
 ataaaatgca ttaaaaaata ttttcatact caactacaaa tccatgagta taactataat 3840  
 tataaagcaa tgattagaat ctgacaagga ttctggaaaa ttacataaag gaaagttcat 3900  
 aatgtctaa aacacaagag gacatacttg tattcagtaa catttgcagc ttttctaggt 3960  
 ctgaaaatat atttgttgcc tagtgaataa gcataatggt acaactacaa gtgttttact 4020

ES 2 645 298 T3

cctcatatta acttcggtca ttagaggcca cgatttgaca catttttact caaaacaaaa 4080  
 tgtttgcata tctcttataa tttcaaattc aacacacaac aaataagaga aaaaacaaat 4140  
 aatattaatt tgagaatgaa caaaaggacc atatcattca ttaactcttc tccatccatt 4200  
 tccatttcac agttcgatag cgaaaaccga ataaaaaaca cagtaaatta caagcacaac 4260  
 aatgggtaca agaaaaacag ttttcccaat gccataatac tcaaactcag taggattctg 4320  
 gtgtgtgctc aatgaaactg atgcattgaa cttgacgaac gttgtcgaaa ccgatgatac 4380  
 gaacgaaaagc tgaattccta gctggctgaa tggtagtagt tgttgctgct gtaaataagc 4440  
 aggagagttc aatgctgtca gttggttgaa tggagaagaat tgctgggggt aggcagcaga 4500  
 tagctggctg aatggtagtt gttgttgttg caaataagaa gcagagttca atgcagctag 4560  
 ttggttgaat ggaagaaact gctgttgctg agagtaggca gcaaggtttg ctagcacaag 4620  
 ttgtttagt tgttgtgccc tgatgttttg tgccaataaa tgaccaaaag gtaactgctg 4680  
 taatagggct gatgattggt ggaggaacaa gggtgataaa ggtaagatgc cagctgcat 4740  
 tgctgttat gcataaagat ggcacctcca acgatgggtt gctgcaaggc agggttcctc 4800  
 aaagagaact gtttgtatgg cagcaattgt tgttgctgct gcaggaagggt agcgaccaat 4860  
 gggttagcca ctgccaatgg attaagtaac tgttgtcctg gttgtaggta cgcagcagag 4920  
 ttgacacag ccagttggtt gaatggaagc aactgttgta agtaggcagc agggtttgcc 4980  
 acagctagct gagtcagagc tggtaacaatt tggtagcagca actgttggtg taggtacgta 5040  
 ggtgggcccg ctaccaagat attagccctc cttgccttc ttgccctttt agtgagcgc 5100  
 acaaatgcgt tcattattcc acagtgtc caatgtccta gtgccagtat tccacagttc 5160  
 ctcccaccag ttacttcaat gggcttcgaa catccagccg tgcaagccta caggctacaa 5220  
 ctagcgttg cggcgagcgc cttacaacaa ccaattgcc aattgcaaca acaatccttg 5280  
 gcacatctaa ccctacaaac cattgcaacg caacaacaac aacaacagtt tctgcatca 5340  
 ctgagccacc tagccgtggt gaaccctg acctacttgc aacagcagct gcttgcatcc 5400  
 aaccacttg ctctggcgaa cgtagctgca taccagcaac aacaacagct gcaacagttt 5460  
 atgccagtgc tcagtcaact agccatggtg aacctgccg tctacctaca actactttca 5520  
 tctagcccgc tcgcggtggg caatgcacct acgtacctac aacaacagtt gctgcaacaa 5580  
 attglaccag ctctgactca gctagctgtg gcaaaccctg ctgcctactt acaacagttg 5640  
 cttcattca accaactggc tgtgtcaaac tctgctgctg acctacaaca gcgacaacag 5700

ES 2 645 298 T3

ttacttaatc cattggcagt ggctaacca ttggtcgcta ccttcctgca gcagcaaaa 5760  
 caattgctgc catacaacca gttctctttg atgaaccctg ccttgagca acccatcggt 5820  
 ggaggtgcca tttttaccgg taacaggcaa tcgcagctgg catcttacct ttatcacct 5880  
 tgttctcca acaatcatca gccctattac agcagttacc tttgggtgcat ttattggcac 5940  
 aaaacatcag ggcacaaaa ctacaacaac ttgtgctagc aaaccttgct gctactctc 6000  
 agcaacaaca gtttctcca ttcaaccaac tagctgcatt gaactctgct tcttatttgc 6060  
 aacaacaaca actaccattc agccagctat ctgctgcta cccccagca tttcttccat 6120  
 tcaaccaact gacagctttg aactctctg cttatttaca gcagcaaaa ctactaccat 6180  
 tcagccagct agggatccgg taccgggttc ttctgcgctc tggagtagat aaagctaattg 6240  
 gtctgaagac ccagtgggtg tgatggagaa gtgcacagge atgagagctg tatttatagc 6300  
 tttgattaat taacacaatt tcttgtgttc ttatgccacc gagacggctg taggcagctt 6360  
 catggtttct tgccaaatgt atatgactcg tcaactctct tacgtagcac gtcgatggtt 6420  
 catctggaat cattctgtac ttctgcgtgg ctacagttttg ttgccttcta caggttgttg 6480  
 atctacgtaa aacgaattag atttagcttg acatatggct ttttttttgt tgtaaattta 6540  
 ctttacagct caaggatfff tgcctgtcc ggctatfff atttttcatg aaacgatctt 6600  
 tgtaatgcaa tatgagttgt ttgtaatgtc ttgtgagctg taagcatgta tatcagatga 6660  
 gtatgatctc ggcatgactc accgtgttcc tttgcacaca gagaggattt gtttgattgt 6720  
 ttcttaccba atacccttga cgtgcaatff tggttgatgt tctgtgagtt gtttaaggata 6780  
 caacaaatc ttggagctff acatgccaat gcattggtgt ttcgtgttcc tcaccactff 6840  
 aggacttata cggttgcacc tggatgatcg aaggggattg ggagagatta aatctcttc 6900  
 tattcaatff tgactaggaa gagatttaat cgtttccaac ccttttcgat ccagacgtaa 6960  
 gcgaacaagt tttttatttg gataccctct tattcatctt aatacacaca tgtattaagt 7020  
 tgcactagtt atatgccctg gcattgctac ggtttatata tatatatata tatatgtata 7080  
 tatatatata tgatatatga taaatfffgt ttaataaaa catatgtfff ctattgatta 7140  
 ggttgtgtga atatggagcc aacaaccaat atccagaaca cttatacata atttcacctt 7200  
 atttgtaca taaactctct tattatagta gttagagaaga gattataaga gtgcggggtg 7260  
 attataaaga aatgtaggag ttttttaata atattgacgc gggacaagct tactagtagc 7320  
 ttgttaacgc ggccgcatcg atcgtgaagt ttctcatcta agccccatt tggacgtgaa 7380  
 tgtagacacg tcgaaataaa gatttccgaa ttagaataat ttgtttattg ctttcgcta 7440

ES 2 645 298 T3

taaatacgac	ggatcgtaat	ttgtcgtttt	atcaaaatgt	actttcattt	tataataacg	7500
ctgCGGacat	ctacatTTTT	gaattgaaaa	aaaattggta	attactcttt	ctttttctcc	7560
atattgacca	tcatactcat	tgctgatcca	tgtagatttc	cggacatga	agccatttac	7620
aattgaatat	atcctgccc	cgctgccc	ttgcaccgg	tggagcttgc	atggtggttt	7680
ctacgcagaa	ctgagccggt	taggcagata	atttccattg	agaactgagc	catgtgcacc	7740
ttcccccaa	cacggtgagc	gacggggcaa	cggagtgatc	cacatgggac	tttt	7794

**REIVINDICACIONES**

1. Una construcción de ADN recombinante para la supresión de al menos un gen diana de planta nativa que comprende en orden 5' a 3' un elemento promotor unido de manera operable a un primer elemento de ADN orientado antisentido en relación con el al menos un gen diana y un segundo elemento de ADN orientado sentido en relación con el al menos un gen diana que comprende 50 a 5.000 nucleótidos, en la que el elemento de ADN orientado sentido no es más de aproximadamente la mitad de la longitud del elemento de ADN orientado antisentido, y el ARN orientado sentido transcrito por el ADN orientado sentido es complementario al extremo más 5' del ARN orientado antisentido transcrito por el elemento de ADN orientado antisentido, en la que dicho ARN transcrito forma un bucle de ARN orientado antisentido para suprimir dicho al menos un gen diana, y en la que dicho elemento de ADN orientado antisentido comprende, en serie, segmentos de dos o más genes dirigidos para supresión.
2. La construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que dicho bucle de ARN orientado antisentido se cierra con un segmento de ARN de doble sentido.
3. La construcción de ADN recombinante de la reivindicación 2, en la que una cadena de dicho segmento de ARN de doble cadena es idéntica al ARNm de un gen dirigido para supresión.
4. La construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que dicho elemento de ADN orientado sentido comprende de 50 a 500 nucleótidos.
5. La construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que dicho elemento de ADN orientado sentido no es más de aproximadamente un tercio de la longitud del elemento de ADN orientado antisentido.
6. La construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que dicho elemento de ADN orientado sentido no es más de aproximadamente un cuarto de la longitud del elemento de ADN orientado antisentido.
7. Un procedimiento para generar ARN orientado antisentido en una planta para la supresión de un gen diana, comprendiendo dicho procedimiento proporcionar, en las células de dicha planta, una construcción de ADN recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

Figura 1

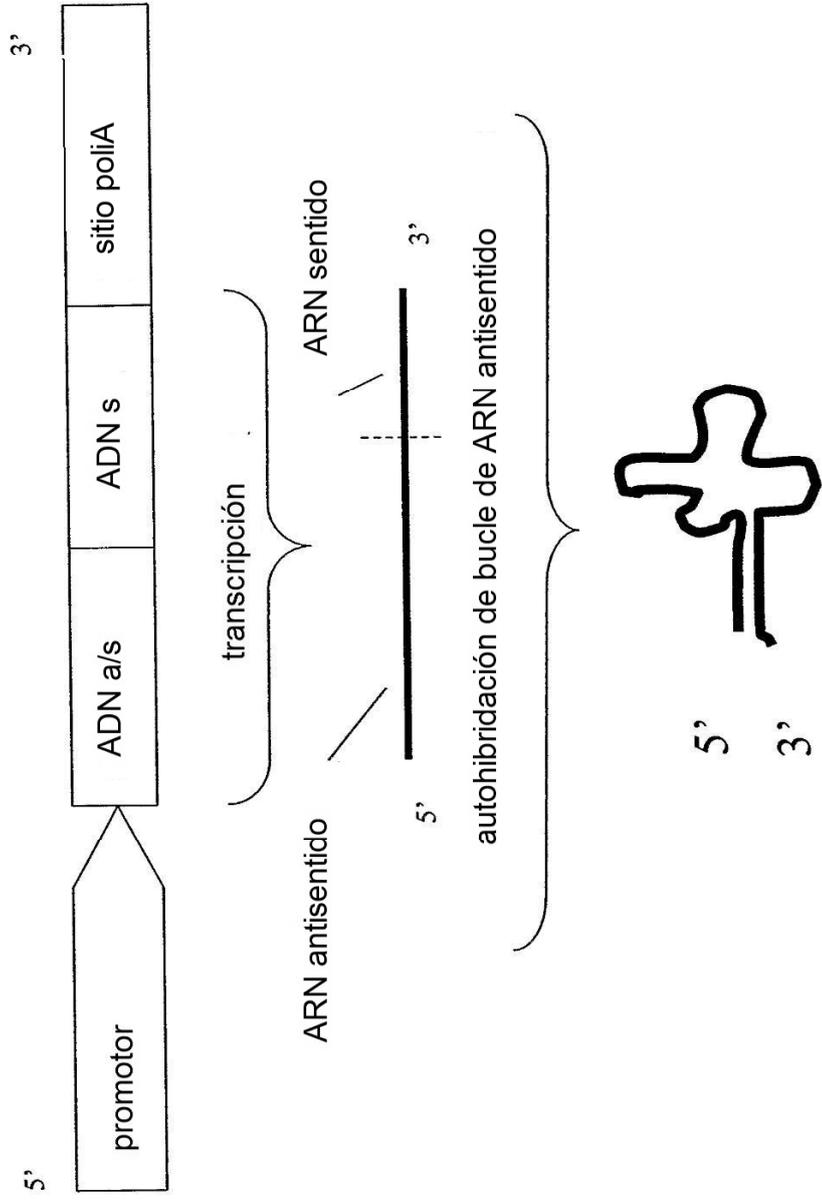


Figura 2

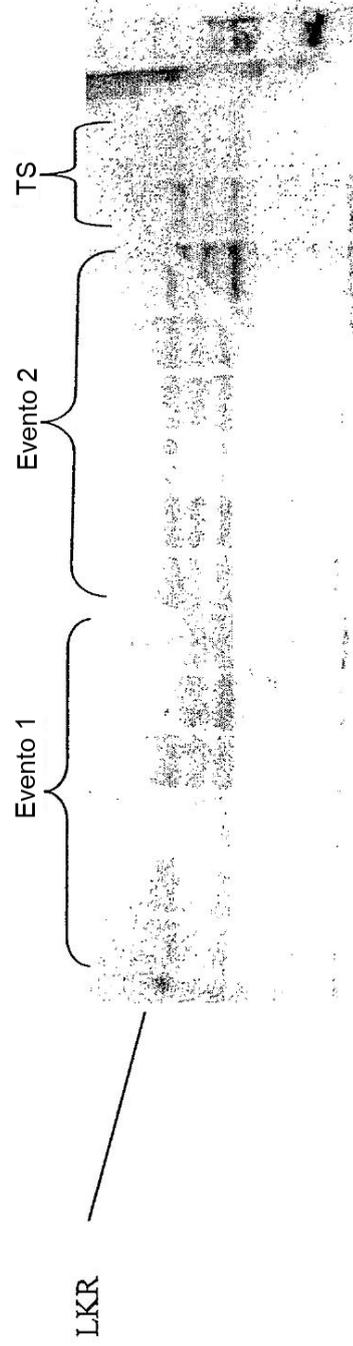


Figura 3

