

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 700**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2007 PCT/US2007/019283**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2008 WO08027592**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2007 E 07837683 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2059596**

54 Título: **ARN pequeños en fase**

30 Prioridad:

31.08.2006 US 841608 P

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

21.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ALLEN, EDWARDS;
GUO, LIANG;
HEISEL, SARA E.;
IVASHUTA, SERGEY I. y
ZHANG, YUANJI I.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 655 700 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

ARN pequeños en fase

Campo de la invención

5 Esta memoria descriptiva describe construcciones de ADN recombinante y ARN pequeños en fase útiles para regular la expresión de uno o más genes de interés. También se describen en esta memoria descriptiva células de plantas transgénicas no naturales, plantas y semillas que contienen una construcción de ADN recombinante de la presente invención.

Antecedentes de la invención

10 Los procedimientos de supresión génica incluyen el uso de antisentido, co-supresión e interferencia de ARN. La supresión del gen antisentido en las plantas es descrita por Shewmaker *et al.* en las patentes de los Estados Unidos 5,107,065, 5,453,566 y 5,759,829. La supresión génica en bacterias que usa ADN que es complementario al ARNm que codifica el gen que se va a suprimir se describe por Inouye *et al.* en las patentes de los Estados Unidos 5,190,931, 5,208,146 y 5,272,065. La interferencia de ARN o la supresión de genes mediada por ARN ha sido descrita por, e. gramo., Redenbaugh *et al.* en "Evaluación de seguridad de frutas y verduras genéticamente modificadas", CRC Press, 1992; Chuang *et al.* (2000) PNAS, 97: 4985-4990; y Wesley *et al.* (2001) Plant J., 27: 581-590.

20 Se han descrito varias vías celulares implicadas en la supresión génica mediada por ARN, cada una distinguida por una vía característica y componentes específicos. Véanse, por ejemplo, las reseñas de Brodersen y Voinnet (2006), Trends Genetics, 22: 268-280, y Tomari y Zamore (2005) Genes & Dev., 19: 517-529. La vía de ARNip implica la división no escalonada de un ARN bicatenario a pequeños ARN interferentes ("ARNip"). La vía de microARN implica microARN ("miARN"), ARN no proteicos que codifican generalmente entre aproximadamente 19 y aproximadamente 25 nucleótidos (habitualmente aproximadamente 20 - 24 nucleótidos en plantas) que guían la escisión en *trans* de transcripciones diana, regulando negativamente la expresión de genes involucrados en varias vías de regulación y desarrollo; véase Ambros *et al.* (2003) ARN, 9: 277 - 279. Los miARN de plantas se han definido como un conjunto de características que incluyen un precursor de bucles-tallo emparejado que se procesa mediante DCL1 a un único miARN específico de ~ 21 nucleótidos, expresión de un solo par de especies de miARN y miARN * del precursor de ARN bicatenario con salientes en 3' de dos nucleótidos y silenciamiento de objetivos específicos en *trans*. Véase Bartel (2004) Cell, 116: 281 - 297; Kim (2005) Nature Rev. Mol. Cell Biol., 6: 376 - 385; Jones-Rhoades *et al.* (2006) Annu. Rev. Plant Biol., 57: 19 - 53; Ambros *et al.* (2003) ARN, 9: 277 - 279. En la vía de ARNip de acción *trans* ("ta-ARN i"), los miARN sirven para guiar el procesamiento en fase de transcritos primarios de ARNip en un procedimiento que requiere una ARN polimerasa dependiente de ARN para la producción de un precursor de ARN de doble cadena; los ARN i de acción *trans* se definen por la falta de estructura secundaria, un sitio objetivo de miARN que inicia la producción de ARN bicatenario, requisitos de DCL4 y una ARN polimerasa dependiente de ARN (RDR6) y producción de múltiples pequeñas fases perfectamente en fase de ~21 nt ARN con dúplex perfectamente coincidentes con salientes en 3'de 2 nucleótidos (véase Allen *et al.* (2005) Cell, 121: 207-221).

35 La presente invención describe una nueva ruta para la supresión génica mediada por ARN, basada en un locus endógeno denominado "locus de ARN pequeño en fase", que transcribe a un transcrito de ARN formando una estructura replegada individual que se divide en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños (denominados "ARN pequeños en fase") capaces de suprimir un gen diana. A diferencia de los ARNip, un transcrito de ARN pequeño en fase se divide en fase. En contraste con los miARN, un transcrito pequeño de ARN en fase se escinde mediante DCL4 o una ribonucleasa ortóloga tipo DCL4 (no DCL1) a múltiples ARN pequeños abundantes capaces de silenciar un gen diana. En contraste con la vía ta-ARNip, el locus de ARN pequeño en fase transcribe a un transcrito de ARN que forma ARN hibridado independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN y sin un sitio diana de miARN que inicia la producción de ARN bicatenario. Las nuevas construcciones de ADN recombinante diseñadas en base a un locus de ARN pequeño en fase son útiles para la supresión de uno o múltiples genes diana, sin el uso de miARN, taiARN o vectores de expresión diseñados para formar una estructura en horquilla para procesar a ARNip. Además, los sitios de reconocimiento correspondientes a un ARN pequeño en fase son útiles para la supresión de una secuencia diana en una célula o tejido en la que el ARN pequeño en fase apropiado se expresa endógenamente o como un transgén.

Sumario de la invención

50 En un aspecto, la presente invención proporciona (1) una construcción de ADN recombinante para la supresión génica que comprende un promotor funcional en células vegetales, operativamente unido a ADN recombinante que codifica un transcrito de precursor de ARN pequeño en fase sintética y que comprende una secuencia de nucleótidos de una secuencia de molde de ARN pequeño en fase, en el que dicho promotor es heterólogo para dicho ADN recombinante, y en el que dicha secuencia de molde de ARN pequeño en fase comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de la SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 33, SEQ ID NO. 69, y la secuencia de ADN que codifica SEQ ID NO. 34, en el que dicho transcrito de precursor de ARN pequeño en fase sintético conserva la estructura secundaria del

transcrito de dicha secuencia de molde de ARN pequeño en fase, en el que dicha estructura secundaria comprende ARN hibridado que forma una estructura replegada que incluye dos brazos monocatenarios antiparalelos,

donde un brazo es sustancial pero no perfectamente complementario con el otro brazo,

5 en el que el apareamiento de bases entre los dos brazos de la estructura replegada da como resultado un ARN de doble cadena sustancialmente pero no perfectamente que incluye apareamientos erróneos,

en el que dicho ARN hibridado comprende al menos tres ARN bicatenarios pequeños contiguos en fase,

en el que cada ARN bicatenario pequeño en fase comprende dos segmentos de ARN antiparalelo de aproximadamente 20 a aproximadamente 27 nucleótidos cada uno con al menos un apareamiento erróneo entre

10 dichos segmentos por lo que dichos apareamientos erróneos se distribuyen a lo largo de dicho ARN hibridado, y

en donde en dicho transcrito de precursor de ARN pequeño en fase sintético al menos uno de los segmentos de ARN se modifica para suprimir al menos un gen diana reemplazando nucleótidos de un segmento de ARN de al menos uno de dichos ARN de doble cadena pequeños en fase en dicho molde de ARN pequeño en fase secuencia con nucleótidos correspondientes a dicho al menos un gen diana,

15 en el que dicho al menos un gen diana se selecciona de múltiples segmentos no consecutivos de un gen diana, alelos múltiples de un gen diana, o múltiples genes diana de una o más especies,

en el que al menos una de dichas dos cadenas antiparalelas de dicho ARN bicatenario pequeño en fase es aproximadamente 95 % complementario a dicho al menos un gen diana, y

en donde dicho promotor es heterólogo a dicho ADN recombinante.

20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona (2) una célula vegetal transgénica que tiene en su genoma la construcción de ADN recombinante como se define en (1) anteriormente. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona (3) una célula vegetal transgénica que tiene en su genoma la construcción de ADN recombinante como se define en (1) anteriormente, en la que (i) dichos ARN de doble cadena pequeños en fase inhiben una función biológica esencial en un objetivo plaga y dicha célula de planta transgénica produce además una

25 o más proteínas insecticidas Bt que son tóxicas para dicha plaga objetivo; o (ii) dichos ARN de cadena doble pequeños en fase silencian un gen de patógeno vírico y dicha célula de planta transgénica expresa además transgénicamente la proteína de cubierta de dicho patógeno vírico. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona (4) una planta transgénica que comprende la célula de planta transgénica no natural como se define en (2) o (3) anteriormente.

30 Otro aspecto de la presente invención es (6) un procedimiento para suprimir al menos un gen diana en una planta o de una plaga o patógeno de dicha planta que comprende (a) transcribir la construcción de ADN recombinante como se define en (1) anteriormente en dicha célula vegetal, o (b) proporcionar ARN de cadena doble pequeños en fase producidos a partir de dicha construcción de ADN recombinante como se define en (1) anterior a dicha planta. Otras realizaciones específicas de la invención se describen en la siguiente descripción detallada.

35 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 representa un ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños ("ARN pequeños en fase") como se describe en el **Ejemplo 1**.

La figura 2 representa un ejemplo de una secuencia de ADN genómico (**SEQ ID NO. 9**) incluyendo la secuencia de ADNc, secuencia intrónica y brazos replegados que transcriben a ARN hibridado como se describe en el

40 Ejemplo 1.

La figura 3 representa los resultados del silenciamiento génico en embriones de maíz usando una construcción de ADN recombinante que incluye ADN que transcribe a ARN que contiene un sitio de reconocimiento que corresponde a al menos un ARN pequeño en fase como se describe en el Ejemplo 2

La figura 4 representa los resultados del análisis de transferencia Northern de tejido de granos de maíz en desarrollo usando una única sonda de oligonucleótidos con secuencia complementaria a un ARN pequeño en fase endógeno, como se describe en el Ejemplo 2

La figura 5 representa la estructura secundaria predicha de una secuencia de molde de ARN pequeño en fase (**SEQ ID NO. 17**) basado en un locus de ARN pequeño en fase endógena y de una construcción de supresión de genes modificada genéticamente (**SEQ ID NO. 32**) que está diseñado para suprimir genes diana múltiples, como se describe en el Ejemplo 3.

La figura 6 representa la transcripción de ARN (**SEQ ID NO. 34**) que contiene ARN hibridado en una estructura replegada única predicha a partir de un locus de ARN pequeño en fase endógena (LOC_Os12g42380.1 | 11982.m08017) que tiene la secuencia de **SEQ ID NO. 33**, como se describe en el Ejemplo 4. Este locus se

55 **Tabla 4.** La transcripción (**SEQ ID NO. 34**) incluye una secuencia de flanqueo en 5' (**SEQ ID NO. 66**) y 3' secuencia flanqueante (**SEQ ID NO. 67**), y una secuencia de espaciador (**SEQ ID NO. 68**), localizado entre los brazos 5' y 3' de la estructura replegada. Los extremos 5' y 3' de la transcripción se indican en la parte superior de la figura; en la parte inferior de la figura, se muestra que la transcripción tiene un giro o bucle compacto de solo 3 nucleótidos.

La figura 7A representa la pequeña abundancia de ARN en transcripciones por un cuarto de millón de secuencias ("tpq") a lo largo de aproximadamente 2 kilobases del locus de ARN pequeño en fase que tiene la secuencia de **SEQ ID NO. 33**, como se describe en el Ejemplo 4.

Figura 7B representa una vista ampliada de esta pequeña región de ARN y la fase de 21 nucleótidos de la

pequeña abundancia de ARN.

La **figura 8** representa los resultados de los estudios que caracterizan adicionalmente el locus de ARN pequeño en fase Os06g21900, como se describe en el Ejemplo 5. **Figura 8A** representa el transcrito correspondiente a un precursor clonado del locus de sARN en fase Os06g21900. Este precursor contenía los ARN pequeños en fase distribuidos entre dos regiones a lo largo de la transcripción. **Figura 8B** representa los dos exones (exones 2 y 3, indicados por las regiones sombreadas) contenidos dentro de este locus y que forman una estructura larga, imperfecta y retrógrada que contiene ocho ARN pequeños en fase de 21 nucleótidos, separados por un intrón de ~1, 2 kB. **Figura 8C** representa los resultados del análisis de transferencia Southern que confirma que la expresión del ARN pequeño en fase del locus de sARN en fase Os06g21900 se encuentra en el grano de arroz pero no en las plántulas de arroz o en otras especies de plantas probadas. **Figura 8D** representa los resultados del análisis de transferencia Southern de los transformados *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) ecotipo y mutantes *dcl1-7* y *dcl4-1*; la transferencia se analizó con sondas correspondientes a ARN pequeños en fase "P7" (**SEQ ID NO. 6**), y "P5" (**SEQ ID NO. 4**), un miARN canónico (miR173) y un ARN *i* que actúa en trans (ta-siR255). Estos resultados demuestran que el locus de ARN pequeño en fase Os06g21900 se procesó de manera eficiente en una planta de dicotiledóneas y requirió que DCL4, y no DCL1, se escindiera en fase.

La **figura 9** representa las estructuras de ARN hibridadas predichas a partir de transcripciones de un locus de ARN pequeño en fase que ocurre en la naturaleza y un locus de ARN pequeño en fase sintética, como se describe en el Ejemplo 7. **Figura 9A** representa la estructura replegada de la transcripción del locus endógeno de ARN pequeño en fase Os06g21900 (**SEQ ID NO. 69**); **Figura 9B** representa la estructura replegada del precursor de ARN pequeño en fase sintético codificado por **SEQ ID NO. 77**.

Descripción detallada

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. En general, la nomenclatura utilizada y los procedimientos de fabricación o de laboratorio descritos a continuación son bien conocidos y habitualmente empleados en la técnica. Se usan procedimientos convencionales para estos procedimientos, tales como los provistos en la técnica y varias referencias generales. A menos que se indique lo contrario, se dan secuencias de ácidos nucleicos en el texto de esta memoria descriptiva, cuando se leen de izquierda a derecha, en la dirección de 5' a 3'. Las secuencias de ácido nucleico pueden proporcionarse como ADN o como ARN, como se especifica; la divulgación de uno necesariamente define al otro, como es conocido por un experto en la técnica. Cuando se proporciona un término en singular, los inventores también contemplan aspectos de la invención descritos por el plural de ese término. La nomenclatura utilizada y los procedimientos de laboratorio descritos a continuación son los bien conocidos y habitualmente empleados en la técnica. Cuando existan discrepancias en los términos y definiciones utilizados en las referencias, los términos utilizados en esta solicitud tendrán las definiciones dadas. Otros términos técnicos utilizados tienen su significado ordinario en la técnica que se usan, como se ejemplifica en una variedad de diccionarios técnicos.

CONSTRUCCIÓN DE ADN RECOMBINANTE QUE CODIFICA UN TRANSCRITO QUE SE PLIEGA EN ARN HIBRIDADO QUE SE ESCINDE EN FASE *IN VIVO*

Esta memoria descriptiva proporciona una construcción de ADN recombinante que codifica un transcrito que se pliega en ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños para la supresión génica. Por "ARN hibridado" se entiende ARN que ha sufrido apareamiento de bases de Watson-Crick entre cadenas de ARN que son sustancialmente complementarias, formando así ARN que está sustancialmente, pero preferentemente no completamente, emparejado por bases o hibridado entre cadenas; esto está en contraste con la producción convencional de ARN *i* a partir de dos cadenas perfectas o casi perfectas emparejadas por bases que forman ARN completamente bicatenario. En un aspecto preferente, el "ARN hibridado" incluye dos cadenas sencillas de ARN que son parte de una sola molécula, en la que las dos cadenas individuales son sustancialmente complementarias y están dispuestas antiparalelas entre sí, lo que permite que las dos cadenas individuales se emparejen por pares. el uno al otro; la formación del ARN hibridado se produce por emparejamiento de bases intramoleculares. En un aspecto alternativo, "ARN hibridado" incluye dos cadenas sencillas de ARN que cada una forma parte de una molécula separada; la formación del ARN hibridado se produce por emparejamiento de bases intermoleculares. En un aspecto particularmente preferente, el ADN recombinante codifica un transcrito de ARN que forma una estructura replegada que incluye dos brazos monocatenarios antiparalelos, en el que un brazo es sustancial pero no perfectamente complementario con el otro brazo y el apareamiento de bases entre los dos brazos de la estructura replegada da como resultado ARN sustancialmente bicatenario sustancialmente pero no perfectamente que incluye apareamientos erróneos; preferentemente, los apareamientos erróneos se distribuyen a lo largo de la longitud del ARN hibridado (tal como al menos un apareamiento erróneo dentro de un segmento dado de 21 nucleótidos contiguos), tal como se representa en la figura 1, la figura 6 y la figura 8B. Por tanto, en un aspecto preferente de esta memoria descriptiva, el ARN hibridado incluye una estructura derivada de un transcrito de un locus de ARN pequeño en fase que se produce de forma natural, tal como una estructura seleccionada a partir de las estructuras representadas en la **figura 1, la figura 5, la figura 6, y la figura 8B**.

El ARN hibridado se produce independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN; esto está en contraste con *trans*-Producción de ARN *i* en donde el ARN bicatenario se forma mediante la acción de una ARN polimerasa dependiente de ARN que sintetiza una cadena complementaria usando la transcripción de ARN original

como molde. Preferentemente, los nucleótidos que forman el ARN hibridado son nucleótidos del transcrito de ARN original (la cadena "más") transcritos de la construcción de ADN recombinante, y no nucleótidos en una segunda molécula de ARN tal como una (la cadena "negativa") formada por la acción de una ARN polimerasa dependiente de ARN en la transcripción de ARN original.

5 Por "dividido en fase" *in vivo* significa que el ARN hibridado se procesa enzimáticamente o se "corta" *in vivo* en segmentos más cortos en los que el sitio de escisión no está distribuido aleatoriamente a lo largo del ARN hibridado. El ARN hibridado se procesa *in vivo* mediante una ribonucleasa en segmentos múltiples, más cortos, sustancialmente (pero preferentemente no perfectamente) bicatenarios, es decir, múltiples ARN pequeños sustancialmente de doble cadena, que están dispuestos de forma contigua, tal como se representa en la figura 1, la figura 6 y la figura 8B; esto está en contraste con los microARN canónicos, en los que hay una acumulación sustancial de solo un único microARN maduro del transcrito precursor. El ribonucleótido escinde el ARN hibridado de forma no aleatoria, lo que da como resultado una distribución de frecuencia de los múltiples pequeños ARN bicatenarios que están en fase; esto está en contraste con la producción de ARNip convencional en donde el sitio de escisión no da como resultado una distribución de frecuencia en fase de ARNip. Preferentemente, la fase de esta distribución de frecuencia es de aproximadamente 21 nucleótidos, tal como se representa en la figura 7. Por lo tanto, los múltiples ARN bicatenarios pequeños producidos a partir de una construcción recombinante de la presente invención se denominan "ARN pequeños en fase". El término "ARN pequeños en fase" también se aplica a una única cadena del par de cadenas que forma un pequeño ARN bicatenario dado producido a partir de una construcción recombinante de la presente invención; en un aspecto preferente descrito en el presente documento, una hebra del par se acumula a un nivel mayor que el otro.

En un aspecto preferente, el ARN hibridado se escinde en fase *in vivo* por una ribonucleasa que no sea una ribonucleasa DCL1. En una realización más preferente, el ARN hibridado se escinde en fase *in vivo* mediante DCL4 o una ribonucleasa de tipo DCL4 (tal como un ortólogo DCL4 de cualquier planta de monocotiledóneas o dicotiledóneas, tales como plantas de interés comercial o agrícola, tales como plantas de cultivo (especialmente plantas de cultivo utilizadas para alimentación humana o animal), madera, árboles y plantas que producen fibra, pulpa o celulosa, plantas vegetales, plantas frutales y plantas ornamentales, como las que se enumeran a continuación bajo el título "Fabricación y uso de células vegetales transgénicas y plantas transgénicas") en múltiples cadenas bicatenarias pequeñas ARN ("ARN pequeños en fase") para la supresión génica.

En un aspecto preferente, el ARN hibridado se escinde en fase *in vivo* a al menos tres pequeños ARN bicatenarios ("ARN pequeño en fase"). Varias realizaciones abarcadas por la presente invención incluyen construcciones de ADN recombinante que dan lugar a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o incluso más ARN pequeños en fase, respectivamente.

Cada pequeño ARN en fase es contiguo al siguiente; ejemplos de esta disposición se representan en la figura 1, la figura 6 y la figura 8B. Cada ARN pequeño en fase incluye dos segmentos de ARN antiparalelos, cada uno de los cuales contiene de aproximadamente 20 a aproximadamente 27 nucleótidos (por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 o 27 nucleótidos). El emparejamiento de bases entre los dos segmentos de ARN antiparalelos es suficiente para que formen un ARN sustancialmente bicatenario. En un aspecto preferente, cada pequeño ARN bicatenario o ARN pequeño en fase incluye al menos un apareamiento erróneo. Una falta de coincidencia generalmente incluye uno o más nucleótidos emparejados sin base (en uno o ambos segmentos), formando un "bache" o "abultamiento" o "asa" dentro del ARN bicatenario apareado en bases. Cada pequeño escalonado puede incluir una o más bases separadas que forman un saliente en uno o en ambos extremos; más preferentemente, el saliente es un alero de 2 nucleótidos tal como se representa en la figura 1, la figura 6 y la figura 8B.

Cada ARN pequeño en fase preferentemente es capaz de suprimir un gen diana. En una realización, la supresión génica por los ARN pequeños en fase es de un gen diana; por ejemplo, cada ARN pequeño en fase suprime el mismo segmento de un solo gen diana o diferentes segmentos de un solo gen diana. En otra realización, la supresión génica por los ARN pequeños en fase es de múltiples genes diana. Lo más preferente es que una de las dos hebras antiparalelas que compone cada ARN pequeño en fase sea sustancialmente complementaria, o casi perfectamente complementaria, o incluso perfectamente complementaria, para un gen o secuencia diana, como se describe a continuación bajo el título "Genes diana"., que también proporciona una discusión detallada de los genes diana adecuados.

La construcción de ADN recombinante puede incluir una secuencia de nucleótidos derivada de una secuencia de molde de ARN pequeño en fase seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 33, la secuencia de ADN que codifica SEQ ID NO. 34, y SEQ ID NO. 69, en el que al menos un segmento de 21 nucleótidos contiguos en la secuencia de molde de ARN pequeño en fase se modifica para suprimir un gen diana (es decir, modificado para suprimir un gen distinto del objetivo nativo del ARN pequeño en fase nativo). En un aspecto preferente de esta memoria descriptiva, la construcción de ADN recombinante incluye una secuencia de nucleótidos derivada de una secuencia de molde de ARN pequeño en fase seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 33, la secuencia de ADN que codifica SEQ ID NO. 34, y SEQ ID NO. 69, en el que se modifican segmentos múltiples de aproximadamente 20 a aproximadamente 28 (por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28) nucleótidos contiguos de modo que la transcripción se escinde en fase *in vivo* a múltiples ARN pequeños de fase sintética que suprimen un gen diana.

En otro aspecto preferente de esta memoria descriptiva, la construcción de ADN recombinante incluye al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en **SEQ ID NO. 18**, **SEQ ID NO. 23**, **SEQ ID NO. 27**, la secuencia de ADN que codifica **SEQ ID NO. 66**, la secuencia de ADN que codifica **SEQ ID NO. 67**, y la secuencia de ADN que codifica **SEQ ID NO. 68**. **UN CONSTRUCTO DE ADN RECOMBINANTE QUE TRANSCRIBE A UNA PRIMERA Y SEGUNDA SERIE DE SEGMENTOS DE ARN CONTIGUO QUE FORMULAN ARN HIBRIDO QUE SE CLARO EN FASE IN VIVO**

Otro aspecto de esta memoria descriptiva proporciona una construcción de ADN recombinante que incluye ADN que transcribe a: (a) una primera serie de segmentos de ARN contiguos y (b) una segunda serie de segmentos de ARN contiguos, en donde la primera serie de segmentos de ARN contiguos se hibridan *in vivo* a la segunda serie de segmentos de ARN para formar ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños ("ARN pequeños en fase") para la supresión génica. Esta construcción de ADN recombinante puede incluir un locus de ARN pequeño en fase que se produce de forma natural, tal como se describe en esta descripción, o puede incluir una secuencia sintética no natural. Más preferentemente, el ARN hibridado se escinde en fase mediante DCL4 o una ribonucleasa de tipo DCL4 (como un ortólogo DCL4 de cualquier planta de monocotiledóneas o dicotiledóneas, como las enumeradas a continuación bajo el título "Fabricación y uso de células vegetales transgénicas y plantas transgénicas").

En aspectos preferentes de la construcción de ADN recombinante, cada uno de los segmentos de ARN consta de entre 20 y 27 nucleótidos. En un aspecto particularmente preferente, la primera y la segunda serie incluyen segmentos de ARN de 21 nucleótidos. Cada par de ARN pequeños que componen un pequeño ARN bicatenario dado ("ARN pequeño en fase") puede tener la misma longitud, o puede tener diferentes longitudes, como se ilustra en la figura **8B** y **Tabla 4**. En un aspecto preferente, el par de ARN pequeños que forman un pequeño ARN bicatenario dado ("ARN pequeño en fase") es un par de ARN pequeños de 21 nucleótidos. En un aspecto, los segmentos de ARN contiguos son todos del mismo tamaño. En un aspecto preferente, todos los segmentos de ARN consisten en 21 nucleótidos. En otro aspecto, los segmentos de ARN varían en tamaño; preferentemente tienen un tamaño tal que cuando la primera serie y la segunda serie de segmentos de ARN contiguos se hibridan, los segmentos individuales se alinean de una manera que permite la división en fase a los pequeños ARN de doble cadena pretendidos. En un aspecto preferente, la primera y la segunda serie de segmentos de ARN contiguos contienen un número igual de segmentos de ARN que están dispuestos de manera que cuando la primera serie y la segunda serie de segmentos de ARN contiguos hibridan y forman un ARN dúplex (ARN hibridado), un ARN el segmento de un tamaño dado en la primera serie se hibrida con un segmento de ARN correspondiente en la segunda serie de tamaño equivalente.

En un aspecto preferente de la construcción de ADN recombinante, las cadenas del ARN hibridado se localizan en una única molécula y la construcción además incluye ADN que transcribe a un espaciador que une la primera y la segunda serie de segmentos de ARN contiguos. El espaciador generalmente incluye ADN que no se corresponde con el gen diana (aunque en algunas realizaciones puede incluir una secuencia sentido o antisentido del gen diana). El espaciador incluye al menos aproximadamente 4 nucleótidos; en diversas realizaciones, el espaciador contiene al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, o al menos aproximadamente 150 nucleótidos. En una realización, el espaciador es una secuencia de nucleótidos contigua derivada del espaciador de un transcrito de un locus de ARN pequeño en fase que se produce de forma natural. Ejemplos de espaciadores son provistos por **SEQ ID NO. 23** y **SEQ ID NO. 68** así como espaciadores que tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia con cualquiera de **SEQ ID NO. 23** y **SEQ ID NO. 68**.

En un aspecto, el espaciador está diseñado para transcribirse en ARN monocatenario o al menos parcialmente ARN bicatenario (tal como en una disposición de "bucle de tallo besante"), o a un ARN que asume una estructura secundaria o de tres cadenas. configuración dimensional (por ejemplo, un gran bucle de la secuencia antisentido del gen diana o un aptámero) que confiere al transcrito una característica deseada adicional, tal como una mayor estabilidad, vida media aumentada *in vivo*, o especificidad celular o tisular. En un ejemplo, el espaciador se transcribe a un bucle de estabilización que une la primera y la segunda serie de segmentos de ARN contiguos (véase, por ejemplo, Di Giusto y King (2004) *J. Biol. Chem.*, 279: 46483-46489) En otro ejemplo, el espaciador transcribe ARN que incluye un aptámero de ARN (por ejemplo, un aptámero que se une a un ligando específico de la célula) que permite la orientación específica de células o tejidos de los ARN pequeños en fase.

En muchos aspectos, la construcción de ADN recombinante incluye adicionalmente ADN que codifica la secuencia flanqueante 5' (por ejemplo, **SEQ ID NO. 18** y **SEQ ID NO. 66**) y / o 3' secuencia de flanqueo (por ejemplo, **SEQ ID NO. 27** y **SEQ ID NO. 67**) que son adyacentes a la parte de la transcripción que es el ARN hibridado. En otros aspectos de la construcción de ADN recombinante, las cadenas del ARN hibridado se localizan en moléculas separadas. Los aspectos preferentes incluyen una construcción de ADN recombinante que incluye al menos una secuencia de nucleótidos derivada de un transcrito de un locus de ARN pequeño en fase que se produce de forma natural seleccionado del grupo que consiste en la secuencia flanqueante 5', la secuencia flanqueante 3' y la secuencia espaciadora. Otros aspectos incluyen una construcción de ADN recombinante que incluye al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en **SEQ ID NO. 18**, **SEQ ID NO. 23**, **SEQ ID NO. 27**, la secuencia de ADN que codifica **SEQ ID NO. 66**, la secuencia de ADN que codifica **SEQ ID NO. 67**, y la secuencia

de ADN que codifica **SEQ ID NO. 68**. Aspectos adicionales incluyen una construcción de ADN recombinante que incluye al menos una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con cualquiera de **SEQ ID NO. 18**, **SEQ ID NO. 23**, **SEQ ID NO. 27**, la secuencia de ADN que codifica **SEQ ID NO. 66**, la secuencia de ADN que codifica **SEQ ID NO. 67**, y la secuencia de ADN que codifica **SEQ ID NO. 68**.

5 Las construcciones de ADN recombinante están diseñadas para suprimir uno o más genes diana como se describe a continuación bajo el título "Genes diana". La construcción está diseñada de modo que cada segmento de ARN de la primera serie se hibrida con un segmento de ARN de la segunda serie; la transcripción transcrita de la construcción se divide en fase *in vivo*, dando como resultado múltiples ARN bicatenarios pequeños ("ARN pequeños en fase") que corresponden a los segmentos de ARN hibridados emparejados. Preferentemente, cada uno de los ARN pequeños en fase contiene al menos un apareamiento erróneo. Un apareamiento erróneo generalmente incluye uno o más nucleótidos sin pares de bases (en uno o ambos segmentos), formando un "bache" o "abultamiento" o "asa" dentro del ARN bicatenario emparejado por pares de base. En un aspecto preferente, cada ARN pequeño en fase incluye una o más bases desaparejadas que forman un saliente en uno o en ambos extremos; más preferentemente, el saliente es un alero de 2 nucleótidos tal como se representa en la figura 1, la figura 6 y la figura 8B. En un aspecto preferente, al menos uno de los ARN pequeños en fase está diseñado para suprimir uno o más genes diana; es decir, una de las dos hebras antiparalelas que conforman el ARN pequeño en fase es sustancialmente complementaria a un gen diana.

La primera y la segunda serie de segmentos de ARN contiguos están diseñadas para que cuando la primera serie y la segunda serie de segmentos de ARN contiguos se hibriden y formen un ARN dúplex (ARN hibridado), los pequeños ARN bicatenarios resultantes de la escisión en fase de la hibridación El ARN silencia el gen o genes diana. Lo más preferentemente, la estructura secundaria del transcrito se mantiene de modo que sea sustancialmente similar a la de un locus de ARN pequeño en fase que se produce de forma natural (por ejemplo, como se representa en la figura 1, la figura 6 y la figura 8B).

Un procedimiento general para diseñar segmentos de ARN correspondientes a pequeños ARN en fase para silenciar un gen diana, útil para hacer una construcción de ADN recombinante, incluye los pasos:

(a) Seleccionar una secuencia diana única de al menos 18 nucleótidos específicos para el gen diana, e. gramo. mediante el uso de herramientas de alineación de secuencias como BLAST (consulte, por ejemplo, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410; Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402), por ejemplo, de bases de datos de ADNc de maíz y de ADN genómico, para identificar ortólogos de transcritos diana y cualquier coincidencia potencial con genes no relacionados, evitando así el silenciamiento no intencionado de secuencias no diana.

(b) Analizar el gen diana para secuencias indeseables (por ejemplo, coincide con secuencias de especies no objetivo, especialmente animales), y puntuar cada segmento potencial de 19 meros para el contenido de GC, puntuación de Reynolds (ver Reynolds et al. (2004) *Nature Biotechnol.*, 22: 326-330), y la asimetría funcional caracterizada por una diferencia negativa en la energía libre (" $\Delta\Delta G$ ") (ver Khvorova et al. (2003) *Cell*, 115: 209-216) Preferentemente se seleccionan 19-meros que tienen todas o la mayoría de las siguientes características: (1) una puntuación de Reynolds > 4, (2) un contenido de GC entre aproximadamente 40 % a aproximadamente 60 %, (3) un $\Delta\Delta G$ negativo, (4) una adenosina terminal, (5) falta de una serie consecutiva de 4 o más del mismo nucleótido; (6) una ubicación cerca del extremo 3' del gen diana; (7) diferencias mínimas del transcrito de precursor de ARNip en fase diseñado. Preferentemente, se seleccionan múltiples (3 o más) 19-meros para la prueba.

(c) Determinar el complemento inverso de los 19-meros seleccionados para utilizar en la fabricación de ARN pequeños sintéticos en fase de 21 meros \; el nucleótido adicional en la posición 20 se adapta preferentemente a la secuencia diana seleccionada, y el nucleótido en la posición 21 se elige preferentemente para desaparecer para evitar la propagación del silenciamiento en la transcripción diana;

(d) Probar los ARN pequeños de fase sintética, por ejemplo, en un *Mediado por Agrobacterium* transitorio *Nicotiana benthamiana* ensayo de expresión de ARNip y represión diana; y

(e) Clonar los ARN pequeños más eficaces en fases en una construcción para la transformación estable del maíz (véanse las secciones bajo los encabezados "Fabricación y uso de construcciones de ADN recombinante" y "Fabricación y uso de células vegetales transgénicas y plantas transgénicas").

La construcción de ADN recombinante se prepara mediante técnicas habitualmente utilizadas, tales como las descritas bajo el título "Fabricación y uso de construcciones de ADN recombinante" y se ilustra en los ejemplos de trabajo. La construcción de ADN recombinante es particularmente útil para preparar células de plantas transgénicas, plantas transgénicas y semillas transgénicas como se describe a continuación en "Células de plantas transgénicas y plantas transgénicas".

UNA CONSTRUCCIÓN DE ADN RECOMBINANTE QUE INCLUYE UN SITIO DE RECONOCIMIENTO DE ARN PEQUEÑO EN FASE EXÓGENO

Otro aspecto incluye una construcción de ADN recombinante que incluye un promotor ligado operablemente al ADN que transcribe a ARN que incluye: (a) al menos un sitio de reconocimiento exógeno reconocible por un ARN pequeño en fase expresado en una célula específica de un eucariota multicelular, y (b) diana ARN que se va a

suprimir en la célula específica, en el que el ARN diana debe expresarse en células del eucariota multicelular distintas de la célula específica. El sitio de reconocimiento exógeno incluye una secuencia de ARN que es sustancialmente complementaria, o casi perfectamente complementaria, o incluso perfectamente complementaria, a un ARN pequeño en fase; el sitio de reconocimiento exógeno se hibrida con el ARN pequeño en fase, lo que conduce a la supresión o silenciamiento del ARN diana. El ARN pequeño en fase se puede transcribir a partir de un locus de ARN pequeño en fase endógeno o endógeno, o a partir de un locus de ARN pequeño en fase sintético que se expresa transgénicamente. En diversos aspectos de la construcción de ADN recombinante, el al menos un sitio de reconocimiento exógeno se localiza dentro de al menos uno de: (a) la región 5' no traducida del ARN diana; (b) la región 3' no traducida del ARN diana; y (c) el ARN objetivo.

En otros aspectos, el sitio de reconocimiento exógeno es reconocido y silenciado por un ARN pequeño en fase que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en **de SEQ ID NOS. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, y 65.** En aspectos preferentes, el sitio de reconocimiento exógeno es reconocido y silenciado por un ARN pequeño en fase que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en **de SEQ ID NOS. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 60, 61, 62, 63, 64, y 65.** En un aspecto particularmente preferente, el sitio de reconocimiento exógeno es reconocido y silenciado por un ARN pequeño en fase que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en **de SEQ ID NOS. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 37, 38, 40, 41, 46, 61, 62, 63, 64, y 65.**

CÉLULAS VEGETALES TRANSGÉNICAS NO NATURALES Y PLANTAS TRANSGÉNICAS

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una célula vegetal transgénica no natural que tiene en su genoma cualquiera de las construcciones de ADN recombinante de la presente invención. Por lo tanto, los inventores reivindican una célula de planta transgénica no natural que tiene en su genoma una construcción de ADN recombinante que codifica un transcrito que se pliega en ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños para la supresión génica. Los inventores también describen una célula de planta transgénica no natural que tiene en su genoma una construcción de ADN recombinante que incluye ADN que transcribe a: (a) una primera serie de segmentos de ARN contiguos, y (b) una segunda serie de segmentos de ARN contiguos, en donde primeras series de segmentos contiguos de ARN hibridan *in vivo* a la segunda serie de segmentos de ARN para formar ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños ("ARN pequeños en fase") para la supresión génica. Los inventores describen además una célula vegetal transgénica no natural que tiene en su genoma una construcción de ADN recombinante, que incluye un promotor unido operativamente a ADN que transcribe a ARN que incluye: (a) al menos un sitio de reconocimiento exógeno reconocible por un ARN pequeño en fase expresado en una célula específica de un eucariota multicelular, y (b) ARN objetivo que se va a suprimir en la célula específica, en la que el ARN diana se va a expresar en células del eucariota multicelular distintas de la célula específica.

También se proporcionan una planta transgénica no natural que contiene la célula de planta transgénica no natural de la presente invención, una planta transgénica no natural cultivada a partir de la célula de planta transgénica no natural de la presente invención, y una semilla transgénica no natural producida por la no -plantas transgénicas naturales. La planta transgénica no natural de la presente invención incluye plantas de cualquier etapa de desarrollo, e incluye una planta regenerada transgénica no natural preparada a partir de las células de plantas transgénicas no naturales descritas en el presente documento, o una planta de progenie transgénica no natural (que puede ser una planta de progenie endogámica o híbrida) de la planta regenerada, o semilla transgénica no natural de dicha planta transgénica no natural. También se describe una semilla transgénica no natural que tiene en su genoma una construcción de ADN recombinante de la presente invención. Las células de plantas transgénicas no naturales, las plantas transgénicas no naturales y las semillas transgénicas no naturales se preparan por procedimientos bien conocidos en la técnica, como se describe a continuación bajo el título "Fabricación y uso de células vegetales transgénicas y plantas transgénicas".

La célula vegetal transgénica no natural puede incluir una célula vegetal aislada (por ejemplo, células vegetales individuales o células cultivadas en o sobre un medio de cultivo artificial), o puede incluir una célula vegetal en tejido indiferenciado (por ejemplo, callos o cualquier agregación de células vegetales). La célula de planta transgénica no natural puede incluir una célula vegetal en al menos un tejido diferenciado seleccionado del grupo que consiste en hoja (por ejemplo, pecíolo y hoja), raíz, tallo (por ejemplo, tubérculo, rizoma, estolón, bulbo y corno) tallo (por ejemplo, xilema, floema), madera, semilla, fruta (por ejemplo, nuez, grano, frutos carnosos) y flor (por ejemplo, estambre, filamento, antera, polen, carpelo, pistilo, ovario, óvulos).

La planta vegetal transgénica no natural o la planta transgénica no natural de la invención puede ser cualquier célula de planta o planta de interés adecuada. Ambas células vegetales transformadas transitoriamente y establemente se describen en el presente documento. Se prefieren particularmente plantas transgénicas transformadas de manera estable. En muchas realizaciones preferentes, la planta transgénica no natural es una planta transgénica fértil a partir de la cual se puede recoger la semilla, y la memoria descriptiva describe además semilla transgénica no natural de tales plantas transgénicas, en donde la semilla también contiene preferentemente la construcción recombinante de la presente invención.

En algunas realizaciones de la presente invención, la planta no natural es una planta transgénica no natural, y todas las células (con la posible excepción de células haploides) y los tejidos de la planta contienen la construcción de ADN recombinante de la presente invención. En otras realizaciones, la planta no natural no es completamente transgénica, pero incluye células o tejidos transgénicos no naturales y células o tejidos no transgénicos (por ejemplo, tejido transgénico injertado en tejido no transgénico). En un aspecto particular, la planta incluye un vástago no transgénico y un portainjerto transgénico que incluye la célula de planta transgénica, en donde el vástago no transgénico y el portainjerto transgénico se injertan juntos. Tales aspectos son particularmente útiles cuando la planta es una planta habitualmente cultivada vegetativamente como un injerto injertado en un portainjerto (en donde el injerto y el portainjerto pueden ser de la misma especie o variedad o de diferentes especies o variedades); ejemplos incluyen uvas (por ejemplo, uvas de vino y uvas de mesa), manzanas, peras, membrillo, aguacates, cítricos, frutas de hueso (por ejemplo, melocotones, ciruelas, nectarinas, albaricoques, cerezas), kiwis, rosas y otras plantas de agricultura u ornamentales importancia.

También se describen en el presente documento plantas no naturales que no son transgénicas en el sentido de que tienen ADN recombinante introducido en su genoma, pero son plantas no naturales que tienen un genoma que ha sido modificado artificialmente por medios distintos a la tecnología de ADN recombinante. Tales modificaciones artificiales de la secuencia genómica nativa incluyen inserciones, deleciones, sustituciones, cambios de marco, transposiciones, duplicaciones e inversiones. La modificación artificial de una secuencia genómica nativa se logra por cualquier medio, incluida la mutagénesis por sustancias químicas (tales como metanosulfonato, metanosulfonato de metilo, dietilsulfato), nitrosoguanidina y otros agentes alquilantes, análogos de base tales como 5-bromo-desoxiuridina, agentes de interquelación tales como bromuro de etidio, agentes de reticulación tales como platino y agentes oxidantes tales como ácido nitroso o especies de oxígeno reactivo) o mutagénesis mediante tratamientos físicos (tales como exposición a luz ultravioleta, isótopos radiactivos o radiación ionizante). Tal mutagénesis puede ser aleatoria o no aleatoria (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio). La mutagénesis se puede llevar a cabo con plantas intactas, tejidos vegetales o células vegetales. Un ejemplo no limitante de mutagénesis es el tratamiento del polen de maíz con un agente alquilante. La mutagénesis generalmente se lleva a cabo en una población, después del cribado de esa población para permitir la selección de individuos que tienen la propiedad deseada. Estas plantas no naturales son útiles en formas similares a las descritas a continuación para plantas transgénicas; por ejemplo, pueden cultivarse para la producción de semillas u otras partes cosechables, o usarse para generar generaciones de progenie (incluyendo generaciones de híbridos).

Genes diana

Los ARN pequeños en fase y las construcciones de ADN recombinante que codifican tales se pueden diseñar para suprimir cualquier gen o genes diana. El gen diana puede ser una secuencia traducible (codificante), o puede ser una secuencia no codificante (tal como una secuencia reguladora no codificante), o ambas, y puede incluir al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen diana eucariota, gen diana no eucariota, una secuencia de ADN precursora de microARN y un promotor de microARN. El gen diana puede ser nativo o endógeno de la célula (por ejemplo, una célula de una planta o animal) en la que se transcribe la construcción de ADN recombinante, o puede ser nativa de una plaga o patógeno de la planta o animal en el que el ADN recombinante la construcción se transcribe. El gen diana puede ser un gen exógeno, como un transgén en una planta. Un gen diana puede ser un gen nativo destinado a la supresión, con o sin expresión concurrente de un transgén exógeno, por ejemplo, incluyendo un elemento de expresión génica en la construcción de ADN recombinante a partir de la cual se transcriben los ARN pequeños en fase, o en un recombinante separado Constructo de ADN Por ejemplo, puede ser deseable reemplazar un gen nativo con un homólogo de transgén exógeno.

El gen diana puede incluir un único gen o parte de un solo gen que está destinado a la supresión, o puede incluir, por ejemplo, múltiples segmentos consecutivos de un gen diana, múltiples segmentos no consecutivos de un gen diana, múltiples alelos de un objetivo gen o múltiples genes diana de una o más especies. Un gen diana puede incluir cualquier secuencia de cualquier especie (incluidos los no eucariotas tales como bacterias y virus, hongos, plantas, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas, tales como plantas de cultivo, plantas ornamentales y plantas no domesticadas o silvestres, invertebrados tales como artrópodos, anélidos, nematodos y moluscos, y vertebrados como anfibios, peces, aves, mamíferos domésticos o salvajes e incluso humanos).

En un aspecto, el gen diana es exógeno a la planta en la que se transcribe la construcción de ADN recombinante, pero es endógeno a una plaga o agente patógeno (por ejemplo, virus, bacterias, hongos, oomicetos e invertebrados tales como insectos, nematodos y moluscos) de la planta. El gen diana puede incluir múltiples genes diana, o múltiples segmentos de uno o más genes. En un aspecto preferente, el gen o genes diana es un gen o genes de una plaga de invertebrados o patógeno de la planta. Estos aspectos son particularmente útiles para proporcionar plantas transgénicas que tienen resistencia a una o más plagas de plantas o patógenos, por ejemplo, resistencia a un nematodo como nematodo del quiste de soja o nematodo agallador, a un insecto plaga o al menos a un virus patógeno, bacteria u hongo.

El gen diana puede ser una secuencia traducible (codificante), o puede ser una secuencia no codificante (tal como una secuencia reguladora no codificante) o ambas. Los ejemplos de un gen diana incluyen una secuencia no traducible (no codificante), tal como regiones 5' no traducidas, promotores, potenciadores u otras regiones transcripcionales no codificantes, regiones 3' no traducidas, terminadores e intrones. Los genes diana incluyen

genes que codifican microARN, pequeños ARN interferentes, componentes de ARN de ribosomas o ribozimas, ARN nucleolares pequeños y otros ARN no codificantes (véanse, por ejemplo, secuencias de ARN no codificantes suministradas públicamente en rfam.wustl.edu; Erdmann et al. (2001) *Nucleic Acids Res.*, 29: 189-193; Gottesman (2005) *Trends Genet.*, 21: 399-404; Griffiths-Jones et al. (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33: 121-124) Un ejemplo específico de un gen diana incluye un sitio de reconocimiento de microARN (es decir, el sitio en una cadena de ARN a la que un miARN maduro se une e induce la escisión). Otro ejemplo específico de un gen diana incluye una secuencia precursora de microARN nativa de una plaga o agente patógeno de la planta transgénica, es decir, la transcripción primaria que codifica un microARN, o los intermedios de ARN procesados a partir de esta transcripción primaria (por ejemplo, una pri limitada -miARN o un pre-miARN que puede exportarse desde el núcleo al citoplasma). Véase, por ejemplo, Lee et al. (2002) *EMBO Journal*, 21: 4663-4670; Reinhart et al. (2002) *Genes & Dev.*, 16: 1616-1626; Lund et al. (2004) *Science*, 303: 95-98; y Millar y Waterhouse (2005) *Funct. Integr Genomics*, 5: 129-135. Los genes diana también pueden incluir secuencias traducibles (codificadoras) para genes que codifican factores de transcripción y genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis o catabolismo de moléculas de interés (como aminoácidos, ácidos grasos y otros lípidos, azúcares y otros carbohidratos, polímeros biológicos y metabolitos secundarios que incluyen alcaloides, terpenoides, policétidos, péptidos no ribosómicos y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto).

En muchos aspectos preferentes, el gen diana es un gen esencial de una plaga o agente patógeno de una planta. Los genes esenciales incluyen genes que son necesarios para el desarrollo de la plaga o el agente patógeno de un adulto reproductivo fértil. Los genes esenciales incluyen genes que, cuando son silenciados o suprimidos, resultan en la muerte del organismo (como adulto o en cualquier etapa de desarrollo, incluidos los gametos) o en la incapacidad del organismo para reproducirse con éxito (por ejemplo, Esterilidad en un padre o madre letalidad para el cigoto, embrión o larva). Una descripción de los genes esenciales de nematodos se encuentra, e. Ginebra Kemphues, K. "Essential Genes" (24 de diciembre de 2005), *WormBook*, ed. La comunidad de investigación de *C. elegans*, *WormBook*, doi / 10.1895 / wormbook.1.57.1, disponible en línea en www.wormbook.org. Los ejemplos no limitantes de genes esenciales de nematodos incluyen proteína de esperma principal, ARN polimerasa II y quitina sintasa (véase, por ejemplo, US2004/0098761); genes esenciales de nematodos del quiste de soja adicionales se proporcionan en La patente de Estados Unidos Application 11/360,355, filed 23 February 2006. Una descripción de los genes de los insectos está públicamente disponible en *Drosophila* base de datos del genoma (disponible en línea en flybase.bio.indiana.edu/). La mayoría de lo predicho *Drosophila* se ha analizado la función de los genes mediante una pantalla de interferencia de ARN basada en el cultivo celular, lo que ha permitido identificar 438 genes esenciales; ver Boutros et al. (2004) *Science*, 303: 832-836 y material de apoyo disponible en línea en www.sciencemag.org/cgi/content/full/303/5659/832/DC1. Se proporciona una descripción de genes esenciales bacterianos y fúngicos en la Base de Datos de Genes Esenciales ("DEG", disponible en línea en tubic.tju.edu.cn/deg/); ver Zhang et al. (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32: D271-D272.

Los invertebrados de plagas de plantas incluyen nematodos de plagas, moluscos plaga (babosas y caracoles) e insectos plaga. Los patógenos de interés de la planta incluyen hongos, oomicetos, bacterias (por ejemplo, La bacteria que causa manchado de hojas, escopetazo, agalla y marchitez bacteriana), mollicutes y virus (por ejemplo, Los virus que causan mosaicos, venas, manchas, manchas, o crecimiento anormal). Ver también G. N. Agrios, "Plant Pathology" (Cuarta Edición), Academic Press, San Diego, 1997, 635 pp., para descripciones de hongos, bacterias, mollicutes (incluyendo micoplasmas y espiroplasmas), virus, nematodos, plantas superiores parasitarias y protozoos flagelados, todos los cuales son plagas de plantas o patógenos de interés. Ver también la compilación continuamente actualizada de plagas y patógenos de plantas y las enfermedades causadas por tales en el "Nombres comunes de las enfermedades de las plantas" de la American Phytopathological Society, compilado por el Comité de Normalización de Nombres Comunes para Enfermedades de Plantas de la Sociedad Americana de Fitopatología, 1978-2005, disponible en línea en www.apsnet.org/online/common/top.asp.

Los ejemplos de patógenos fúngicos de plantas de particular interés incluyen, e. g., los hongos que causan el oídio, el óxido, la mancha y el tizón de la hoja, la pudrición de la raíz, la pudrición de la corona, la podredumbre de la cápsula de algodón, el cancro del tallo, el cancro de la ramita, el marchitamiento vascular, el carbón o el moho, incluso *Fusarium* spp., *Phakospora* spp., *Rhizoctonia* spp., *Aspergilo* spp., *Gibberella* spp., *Pyricularia* spp., y *Alternaria* spp.. Ejemplos específicos de hongos patógenos de plantas incluyen *Phakospora pachirhizi* (Roya asiática de la soja), *Puccinia sorghi* (roya común del maíz), *Puccinia polysora* (roya del sur del maíz), *Fusarium oxysporum* y otra *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Exserohilum turcicum* (Tizón de la hoja del maíz del norte), *Bipolaris maydis* (Tizón de la hoja del maíz del sur), *Ustilago maydis* (tizón de maíz), *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*), *Fusarium verticillioides* (*Gibberella moniliformis*), *F. proliferatum* (*G. fujikuroi* var. *intermedia*), *F. subglutinans* (*G. subglutinans*), *Diplodia maydis*, *Sporisorium holci-sorghii*, *Colletotrichum graminicola*, *Setosphaeria turcica*, *Aureobasidium zeae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, y las numerosas especies de hongos proporcionadas en las tablas 4 y 5 de la patente de Estados Unidos 6,194,636. Los ejemplos de patógenos de plantas incluyen patógenos previamente clasificados como hongos, pero clasificados más recientemente como oomicetos. Ejemplos específicos de patógenos de plantas oomicetos de particular interés incluyen miembros del género *Pythium* (p.ej., *Pythium aphanidermatum*) y *Phytophthora* (p.ej., *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*,) y organismos que causan mildiú veloso (por ejemplo, *Peronospora farinosa*).

Los ejemplos de patógenos bacterianos incluyen los micoplasmas que causan la enfermedad de los amarillos y espiroplasmas tales como *Spiroplasma kunkelii*, que causa el truco del maíz, eubacterias como *Pseudomonas*

avenae, *Pseudomonas andropogonis*, *Erwinia stewartii*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xylella fastidiosa*, y las numerosas especies bacterianas enumeradas en la Tabla 3 de La patente de Estados Unidos 6,194,636.

Los ejemplos de patógenos de plantas virales de particular interés incluyen el virus del mosaico enano (MDMV), virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV, anteriormente MDMV cepa B), virus del mosaico del rayado del trigo (WSMV), virus enano clorótico del maíz (MCDV) BYDV, virus bunchy top del banano (BBTV), y los numerosos virus enumerados en el Ejemplo 7 a continuación y en la Tabla 2 de La patente de Estados Unidos 6,194,636.

Los ejemplos de plagas de invertebrados incluyen nematodos del quiste *Heterodera* spp. especialmente el nematodo del quiste de soja *Heterodera glycines*, nematodos del nudo de la raíz *Meloidogyne* spp., nematodos de lanza *Hoplolaimus* spp., especialistas en nematodos *Tylenchorhynchus* spp., nematodos espirales *Helicotylenchus* spp., nematodos lesionales *Pratylenchus* spp., nematodos de anillo *Criconea* spp., nematodos foliares *Aphelenchus* spp. o *Aphelenchoides* spp., gusanos de la raíz del maíz, *Lygus* spp., pulgones e insectos chupadores de savia similares, como la filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*), barrenadores del maíz, gusanos cortadores, gusanos, saltahojas, escarabajos japoneses, saltamontes y otros coleópteros, dípteros y lepidópteros plaga. Los ejemplos específicos de plagas de invertebrados incluyen plagas capaces de infestar los sistemas de raíces de las plantas de cultivo, e. g., gusano de la raíz del maíz del norte (*Diabrotica barberi*), gusano de la raíz del maíz del sur (*Diabrotica undecimpunctata*), Gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera*), pulgón de la raíz del maíz (*Anuraphis maidiradicis*), gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), gusano cortador vítreo (*Crymodes devastador*), gusano cortador sucio (*Feltia ducens*), gusano cortador de arcilla (*Agrotis gladiaria*), gusano de alambre (*Melanotus* spp., *Aeolus mellillus*), gusano de alambre de trigo (*Aeolus mancus*), arena gusano de alambre (*Horistonotus uhlerii*), billbug de maíz (*Sphenophorus maidis*), timothy billbug (*Sphenophorus zaeae*), bluebush billbug (*Sphenophorus parvulus*), botiquín de maíz del sur (*Sphenophorus callosus*), larvas blancas (*Phyllophaga* spp.), gusano de semilla de maíz (*Delia platura*), colaspis de uva (*Colaspis brunnea*), escarabajo de semilla de maíz (*Stenolophus lecontei*) y escarabajo esbelto de semillas de maíz (*Clivinia impressifrons*), así como los nematodos parásitos enumerados en la Tabla 6 de La patente de Estados Unidos 6,194,636.

Las plagas de invertebrados de particular interés, especialmente en las regiones del hemisferio sur (incluyendo América del Sur y Central) incluyen áfidos, gusanos de la raíz del maíz, spodoptera, noctuidea, escarabajo de la papa, *Lygus* spp., cualquier hemíptero, homóptero o heteróptero, cualquier lepidóptero, cualquier coleóptero, nematodos, gusanos cortadores, gusanos de la espiga, gusanos del ejército, barrenadores, rodillos de hojas y otros. Las plagas de artrópodos específicamente descritas en el presente documento incluyen varias especies de gusanos cortadores, incluyendo el gusano cortador (*Agrotis repleta*), gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), gusano cortador (*Anicla ignicans*), gusano cortador granuloso (*Feltia subterranea*), "gusano áspero" (*Agrotis malefida*); Polilla de harina mediterránea (*Anagasta kuehniella*), escarabajo de grano de cuello cuadrado (*Cathartus quadricollis*), escarabajo pulga (*Chaetocnema* spp), polilla del arroz (*Corcyra cephalonica*), gusano de la raíz del maíz o "vaquita de San Antonio" (*Diabrotica speciosa*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), barrenador del tallo menor (*Elasmopalpus lignosellus*), chinche marrón (*Euschistus* spp.), gusano del maíz (*Helicoverpa zea*), escarabajo de grano plano (*Laemophloeus minutus*), polilla looper de hierba (*Mocis latipes*), escarabajo de grano serrado (*Oryzaephilus surinamensis*), polilla de la comida (*Pyralis farinalis*), Polilla india de la harina (*Plodia interpunctella*), áfido de la hoja del maíz (*Rhopalosiphum maidis*), insecto marrón madriguera o "chinche subterránea" (*Scaptocoris castanea*), greenbug (*Schizaphis graminum*), gorgojo del grano (*Sitophilus zeamais*), Polilla del grano Angoumois (*Sitotroga cerealella*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), escarabajo de Cadelle (*Tenebroides mauritanicus*), araña roja de dos manchas (*Tetranychus urticae*), escarabajo rojo de la harina (*Triboleum castaneum*), gusano de la hoja del algodón (*Alabama argillacea*), gorgojo de la cápsula (*Anthonomus grandis*), áfido de algodón (*Aphis gossypii*), mosca blanca de la batata (*Bemisia tabaci*), varias especies de trips (*Frankliniella* spp.), earworm de algodón (*Helicoverpa zea*), "oruga bolillera" (p.ej., *Helicoverpa geletopeon*), oruga del tabaco (*Heliothis virescens*), chinche (*Nezara viridula*), gusano de la cápsula rosado (*Pectinophora gossypiella*), gusano de la remolacha (*Spodoptera exigua*), araña roja (*Tetranychus* spp.), trips de cebolla (*Thrips tabaci*), mosca blanca de invernadero (*Trialeurodes vaporariorum*), oruga de frijol terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*), escarabajo de maíz manchado o "astilo moteado" (*Astylus atromaculatus*), "oruga de la alfalfa" (*Colias lesbia*), "chinche marrón" o "chinche de los cuernos" (*Dichelops furcatus*), "alquiche chico" (*Edessa miditabunda*), escarabajos ampollas (*Epicauta* spp.), "barrenador del brote" (*Epinotia aporema*), "oruga verde del yuyo colorado" (*Loxostege bifidalis*), nematodos del rootknot (*Meloidogyne* spp.), "oruga cuarteadora" (*Mocis repanda*), chinche verde del sur (*Nezara viridula*), "chinche de la alfalfa" (*Piezodorus guildinii*), trébol verde (*Plathyrena scabra*), looper de soja (*Pseudoplusia includens*), polilla Looper "isoca medidora del girasol" (*Rachiplusia nu*), woollybear amarillo (*Spilosoma virginica*), gusano soldado yellowstriped (*Spodoptera ornithogalli*), varios gorgojos de la raíz (familia Curculionidae), varios gusanos de alambre (familia Elateridae) y varias larvas blancas (familia Scarabaeidae). Las plagas de nematodos incluyen las plagas de nematodos del maíz (*Belonolaimus* spp., *Trichodorus* spp., *Longidorus* spp., *Dolichodoros* spp., *Anguina* spp., *Pratylenchus* spp., *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp.), soja (*Heterodera glycines*, *Meloidogyne* spp., *Belonolaimus* spp.), plátanos (*Radopholus similis*, *Meloidogyne* spp., *Helicotylenchus* spp.), caña de azúcar (*Heterodera sacchari*, *Pratylenchus* spp., *Meloidogyne* spp.), naranjas (*Tylenchulus* spp., *Radopholus* spp., *Belonolaimus* spp., *Pratylenchus* spp., *Xiphinema* spp.), café (*Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp.), palma de coco (*Bursaphelenchus* spp.), tomates (*Meloidogyne* spp., *Belonolaimus* spp., *Nacobbus* spp.), uvas (*Meloidogyne* spp., *Xiphinema* spp., *Tylenchulus* spp., *Criconea* spp.), limón y lima (*Tylenchulus* spp., *Radopholus* spp., *Belonolaimus* spp., *Pratylenchus* spp., *Xiphinema* spp.), cacao (*Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis*), piña (*Meloidogyne* spp.,

Pratylenchus spp., *Rotylenchulus reniformis*), papaya (*Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis*), pomelo (*Tylenchulus* spp., *Radopholus* spp. *Belonolaimus* spp., *Pratylenchus* spp., *Xiphinema* spp., y habas (*Meloidogyne* spp.).

5 Los genes diana de las plagas pueden incluir genes de invertebrados para la proteína principal del esperma, alfa tubulina, beta tubulina, ATPasa vacuolar, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, ARN polimerasa II, quitina sintasa, citocromos, miARN, moléculas precursoras de miARN, promotores de miARN, así como otros genes como los descritos en US2006/0021087, WO2005/110068, y en la Tabla II de US2004/0098761. Los genes diana de los patógenos pueden incluir genes para factores de iniciación de la traducción viral, replicantes virales, miARN, moléculas precursoras de miARN, tubulina fúngica, ATPasa fúngica vacuolar, quitina sintasa fúngica, MAP quinasas fúngicas, fosfatasa fúngica Pac1 Tyr / Thr, enzimas implicadas en el transporte de nutrientes (por ejemplo, transportadores de aminoácidos o transportadores de azúcar), enzimas implicadas en la biosíntesis de la pared celular fúngica, cutinasas, enzimas biosintéticas de melanina, poligalacturonasas, pectinasas, pectin liasas, celulasas, proteasas, genes que interactúan con genes de avirulencia de plantas y otros genes implicados en la invasión y replicación del patógeno en la planta infectada. Por lo tanto, un gen diana no necesita ser endógeno para la planta en la que se transcribe la construcción de ADN recombinante. Una construcción de ADN recombinante que codifica ARN pequeños en fase puede transcribirse en una planta y usarse para suprimir un gen de un patógeno o plaga que puede infestar la planta.

20 Los ejemplos específicos de genes diana adecuados también incluyen genes catabólicos de aminoácidos (como el maíz *LKR/SDH* gen que codifica lisina-cetoglutarato reductasa (LKR) y saccharopina deshidrogenasa (SDH) y sus homólogos), genes de zeína de maíz, genes implicados en la síntesis de ácidos grasos (por ejemplo, desaturasas de ácidos grasos microsomales de plantas y tioesterasas acil-ACP de plantas, tales como las descritas en La patente de Estados Unidos Numbers 6,426,448, 6,372,965 y 6,872,872), genes implicados en rutas de biosíntesis de múltiples pasos, donde puede ser de interés regular el nivel de uno o más compuestos intermedios, tales como genes que codifican enzimas para la biosíntesis de polihidroxicanoato (véase, por ejemplo, La patente de Estados Unidos No. 5,750,848); y genes que codifican proteínas de control del ciclo celular, tales como proteínas con actividad similar a la inhibidora de la cinasa dependiente de ciclina (CDK) (véanse, por ejemplo, los genes descritos en el número de publicación de solicitud de patente internacional) WO 05007829A2) Los genes diana pueden incluir genes que codifican proteínas indeseables (por ejemplo, alérgenos o toxinas) o las enzimas para la biosíntesis de compuestos indeseables (por ejemplo, componentes de sabor u olor indeseables). Por lo tanto, un aspecto es una planta o tejido transgénico de dicha planta que se mejora mediante la supresión de proteínas o toxinas alergénicas, e. por ejemplo, un grano de maní, soja o trigo con alergenicidad disminuida. Los genes diana pueden incluir genes implicados en la maduración de la fruta, como la poligalacturonasa. Los genes diana pueden incluir genes en los que la expresión se limita preferentemente a una célula o tejido particular o estadio de desarrollo, o donde la expresión es preferentemente transitoria, es decir, cuando no se desea necesariamente la supresión constitutiva o general, o supresión que se disemina a través de muchos tejidos. Por lo tanto, otros ejemplos de genes diana adecuados incluyen genes que codifican proteínas que, cuando se expresan en plantas transgénicas, hacen que las plantas transgénicas sean resistentes a plagas o patógenos (véanse, por ejemplo, los genes de la colesterol oxidasa como se describe en La patente de Estados Unidos No. 5,763,245); genes donde la expresión es inducida por plagas o patógenos; y genes que pueden inducir o restaurar la fertilidad (véase, por ejemplo, los genes *barstar* / *barnasa* descritos en La patente de Estados Unidos No. 6,759,575).

45 Los ARN pequeños en fase pueden diseñarse para suprimir más específicamente el gen diana, diseñando los ARN pequeños en fase para incluir regiones sustancialmente no idénticas a una secuencia génica no diana. Los genes no diana pueden incluir cualquier gen que no esté destinado a ser silenciado o suprimido, ya sea en una planta que contiene la construcción de ADN recombinante que codifica los ARN pequeños en fase o en organismos que pueden entrar en contacto con los ARN pequeños en fase. Una secuencia génica no diana puede incluir cualquier secuencia de cualquier especie (incluidos los no eucariotas tales como bacterias y virus, hongos, plantas, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas, tales como plantas de cultivo, plantas ornamentales, y plantas no domesticadas o silvestres; invertebrados como artrópodos, anélidos, nemátodos y moluscos, y vertebrados como anfibios, peces, aves, mamíferos domésticos o salvajes, e incluso humanos).

50 En un aspecto, el gen diana es un gen endógeno a una especie dada, tal como una planta dada (tal como plantas importantes comercialmente o agrícolaemente, que incluyen monocotiledóneas y dicotiledóneas), y el gen no diana puede ser, p. g., un gen de una especie no objetivo, como otra especie de planta o un gen de un virus, hongo, bacteria, invertebrado o vertebrado, incluso un ser humano. Un ejemplo es cuando los ARN pequeños en fase se diseñan para suprimir un gen diana que es un gen endógeno a una sola especie (por ejemplo, gusano de la raíz del maíz occidental, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) pero para no suprimir un gen no diana tal como genes de especies relacionadas, incluso estrechamente relacionadas (por ejemplo, gusano de la raíz del maíz del Norte, *Diabrotica barberi* Smith y Lawrence, o gusano de la raíz del maíz del sur, *Diabrotica undecimpunctata*).

60 En otros aspectos (por ejemplo, cuando es deseable suprimir un gen diana en múltiples especies), puede ser deseable diseñar los ARN pequeños en fases para suprimir una secuencia genética diana común a las múltiples especies en las que se silenciará el gen diana. Por lo tanto, un constructo de ADN recombinante que codifica ARN pequeños en fases puede diseñarse para ser específico para un taxón (por ejemplo, específico de un género, familia o incluso un taxón más grande tal como un filum, por ejemplo, virus o artrópodos) pero no para otro taxa (por

ejemplo, plantas o vertebrados o mamíferos). En un ejemplo de este aspecto, una construcción de ADN recombinante que codifica ARN pequeños en fase se puede seleccionar de manera que se dirija a los hongos patógenos (por ejemplo, un *Fusarium* spp.) pero no se dirige a ninguna secuencia genética de hongos beneficiosos.

5 En otro ejemplo de este aspecto, los ARN pequeños en fase para el silenciamiento de genes en la raíz de la raíz del maíz pueden seleccionarse para ser específicos de todos los miembros del género *Diabrotica*. En un ejemplo más de este aspecto, tal *Diabrotica*-se pueden seleccionar ARN pequeños en fases con objetivos para no apuntar a ninguna secuencia genética de los coleópteros beneficiosos (por ejemplo, escarabajos coccinélidos depredadores, habitualmente conocidos como mariquitas o mariquitas) u otras especies de insectos beneficiosos.

10 El grado requerido de especificidad de un ARN para silenciar un gen diana depende de varios factores. Los factores pueden incluir el tamaño de los ARN pequeños en fase que se espera que sean producidos por la acción de una ribonucleasa (preferentemente DCL4 o un ortólogo DCL4) en el ARN hibridado, y la importancia relativa de disminuir el potencial de ARN pequeños en fase para suprimir -target genes. En un ejemplo, donde se espera que los ARN pequeños en fase tengan un tamaño de 21 pares de bases, una realización particularmente preferente incluye ARN para silenciar un gen diana que codifica regiones sustancialmente no idénticas a una secuencia génica no diana, tales como regiones dentro de las cuales cada fragmento contiguo que incluye al menos 21 nucleótidos coincide con menos de 21 (por ejemplo, menos de 21, o menos de 20, o menos de 19, o menos de 18, o menos de 17) de 21 nucleótidos contiguos de un gen no diana secuencia. En otra realización, las regiones sustancialmente no idénticas a una secuencia génica no diana incluyen regiones dentro de las cuales cada fragmento contiguo que incluye al menos 19 nucleótidos coincide con menos de 19 (por ejemplo, menos de 19, o menos de 18, o menos de 17, o menos de 16) de 19 nucleótidos contiguos de una secuencia de gen no diana.

20 En algunos aspectos, puede ser deseable diseñar ARN pequeños en fases para silenciar un gen diana para incluir regiones predichas para no generar polipéptidos indeseables, por ejemplo, rastreando la construcción de ADN recombinante que codifica los ARN pequeños en fase o cada componente ARN en fases pequeñas para secuencias que puede codificar polipéptidos indeseables conocidos o homólogos cercanos de estos. Los polipéptidos indeseables incluyen polipéptidos homólogos a polipéptidos y polipéptidos alergénicos conocidos homólogos a toxinas polipeptídicas conocidas. Se encuentran disponibles secuencias públicamente disponibles que codifican dichos péptidos potencialmente alergénicos indeseables, por ejemplo, la base de datos de alérgenos del Programa de Investigación y Recursos para Alérgenos Alimenticios (FARRP) (disponible en allergenonline.com) o la Base de Datos de Información Biotecnológica para Alimentos (disponible en www.iit.edu/~sgendel/fa.htm) (ver también, por ejemplo, Gendel (1998) Adv. Comida Nutr. Res., 42: 63-92) Las secuencias indeseables también pueden incluir, por ejemplo, aquellas secuencias polipeptídicas anotadas como toxinas conocidas o como alérgenos potenciales o conocidos y contenidas en bases de datos públicamente disponibles tales como GenBank, EMBL, SwissProt y otras, que se pueden buscar mediante el sistema Entrez (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez). Los ejemplos no limitantes de secuencias peptídicas potencialmente alergénicas indeseables incluyen glicinina de soja, oleosina y aglutinina de maní, gluteninas de trigo, caseína, lactoalbúmina y lactoglobulina de leche bovina, y tropomiosina de varios mariscos (allergenonline.com). Ejemplos de péptidos indeseables potencialmente tóxicos incluyen toxina tetánica tetA de *Clostridium tetani*, toxinas diarreicas de *Staphylococcus aureus*, y venenos tales como conotoxinas de *Conus* spp. y neurotoxinas de artrópodos y reptiles (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez).

40 En un ejemplo, la construcción de ADN recombinante que codifica los ARN pequeños en fases o cada ARN pequeño en fase componente se criba para eliminar aquellas secuencias transcribibles que codifican polipéptidos con homología perfecta con un alérgeno o toxina conocido sobre 8 aminoácidos contiguos, o con al menos 35 % de identidad sobre al menos 80 aminoácidos; tales pantallas se pueden realizar en cualquiera y todos los marcos de lectura posibles en ambas direcciones, en posibles marcos de lectura abierta que comiencen con AUG (ATG en el ADN correspondiente) o en todos los marcos de lectura posibles, independientemente de si comienzan con un AUG (o ATG) o no. Cuando se realiza un "golpe" o coincidencia, es decir, cuando una secuencia codifica un polipéptido potencial con homología perfecta con un alérgeno o toxina conocido en más de 8 aminoácidos contiguos (o al menos aproximadamente 35 % de identidad en al menos aproximadamente 80 aminoácidos), se identifica, las secuencias de ácido nucleico correspondientes al golpe pueden evitarse, eliminarse o modificarse cuando se seleccionan las secuencias que se usarán en un ARN para silenciar un gen diana. En un aspecto, la construcción de ADN recombinante que codifica los ARN pequeños en fases o cada uno de los componentes del ARN pequeño en fase se diseña de modo que no se incluyen posibles marcos de lectura abiertos que comiencen con AUG (ATG en el ADN correspondiente).

55 La evitación, eliminación o modificación de una secuencia no deseada se puede lograr mediante cualquiera de una serie de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. En algunos casos, el resultado puede ser secuencias nuevas que se cree que no existen de forma natural. Por ejemplo, se puede evitar ciertas secuencias uniendo secuencias "limpias" en secuencias quiméricas nuevas para usar en la construcción de ADN recombinante que codifica los ARN pequeños en fase.

60 Los solicitantes reconocen que en algunos silenciamientos génicos mediados por dsARN, es posible que las secuencias dsARN imperfectamente coincidentes sean efectivas en el silenciamiento génico. Por ejemplo, se ha demostrado que los apareamientos erróneos cercanos al centro de un sitio complementario de miARN tienen efectos más fuertes sobre el silenciamiento génico del miARN que los apareamientos erróneos más ubicados distalmente.

Véase, por ejemplo, la figura 4 en Mallory et al. (2004) EMBO J., 23: 3356-3364. En otro ejemplo, se ha informado que, tanto la posición de un par de bases desajustadas como la identidad de los nucleótidos que forman el apareamiento erróneo influyen en la capacidad de un ARNip dado para silenciar un gen diana, y que las discordancias adenina-citosina, además de el par base bamboleo G: U, fueron bien tolerados (ver Du et al. (2005) Nucleic Acids Res., 33: 1671-1677) Por lo tanto, cada ARN pequeño en fase no necesita siempre una complementariedad de secuencia del 100 % con el gen diana deseado, pero generalmente tendría una complementariedad sustancial con el gen diana deseado, tal como aproximadamente 95 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 85 % o aproximadamente 80 % de complementariedad con el gen diana deseado. Una cadena del ARN hibridado (o cada segmento pequeño de ARN o ARN en fase) está diseñada preferentemente para tener una complementariedad sustancial con el objetivo pretendido (por ejemplo, un ARN mensajero objetivo o ARN no codificante objetivo), tal como aproximadamente el 95 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 85 %, o aproximadamente 80 % de complementariedad con el objetivo deseado. En un ejemplo no limitante, en el caso de un componente de ARN pequeño en fase que consiste en dos cadenas de 21 nucleótidos, una de las dos cadenas de 21 nucleótidos es sustancial pero no perfectamente complementaria a 21 nucleótidos contiguos de un ARN diana; preferentemente el nucleótido en la posición 21 está desapareado con la posición correspondiente en el ARN diana para evitar la transitividad.

Un experto en la técnica sería capaz de juzgar la importancia otorgada al cribado de regiones que se predice que serán más altamente específicas para el gen diana o que se predice que no generarán polipéptidos indeseables, en relación con la importancia otorgada a otros criterios, tales como el porcentaje de identidad de secuencia con el gen diana deseado o la eficacia de silenciamiento génico predicho de una secuencia dada. Por ejemplo, puede ser deseable que los ARN pequeños en fase sean activos en varias especies, y por lo tanto un experto en la técnica puede determinar que es más importante incluir en el constructo de ADN recombinante que codifica las regiones de ARN pequeños en fase específicas para los diversos especies de interés, pero menos importantes para seleccionar regiones que se predice que tendrán una mayor eficacia de silenciamiento génico o para regiones que se predice que generan polipéptidos indeseables.

Combinaciones de pequeños ARN en fase con composiciones plaguicidas

Los ARN pequeños en fase y las construcciones de ADN recombinante que codifican tales ARN pequeños en fase son útiles para controlar plagas y patógenos de plantas, y por lo tanto la presente invención reivindica además procedimientos de control de plagas y patógenos de plantas en los que se proporciona un ARN pequeño en fase a al menos una célula de la planta a proteger contra la plaga o el patógeno. El ARN pequeño en fase generalmente es proporcionado por *in vivo* transcripción de una construcción de ADN recombinante de la presente invención en una célula de la planta.

Los procedimientos para controlar las plagas y los patógenos de la planta con un ARN pequeño en fase pueden usarse en combinación con otros procedimientos o composiciones para controlar las plagas y los patógenos de las plantas. Por lo tanto, la presente invención también proporciona combinaciones de procedimientos y combinaciones de composiciones para controlar plagas y patógenos de plantas. En una realización preferente, los procedimientos a combinar operan por diferentes mecanismos para proporcionar protección a la planta contra la plaga o el patógeno. Por ejemplo, las plagas de invertebrados pueden controlarse proporcionando un elemento de supresión génica alternativo (tal como un ARNm modificado por ingeniería genética o un ARNip diseñado mediante un transcrito de ARN bicatenario convencional expresado transgénicamente en la planta) diseñado para silenciar un gen de la plaga de invertebrados; véase, por ejemplo, las diversas construcciones de ADN recombinante y los procedimientos para la supresión génica divulgados en US2006/0200878.

Un ejemplo es un procedimiento para controlar plagas de insectos de plantas, que incluye proporcionar al menos un ARN pequeño en fase diseñado para silenciar un gen de plaga de insectos y un agente insecticida (por ejemplo, un *bacilo turingiensis* o proteína insecticida "Bt") a la cual la plaga de insectos es susceptible. Cuando se proporcionan proteínas Bt en la dieta de plagas de insectos (por ejemplo, mediante aplicación tópica a la planta o mediante expresión transgénica en la planta) se exhibe un modo de acción para controlar la plaga de insectos que es dramáticamente diferente del modo de acción del procedimientos y composiciones que usan ARN pequeños en fase. En aspectos preferentes, la combinación da como resultado sinergias que no se conocían previamente en la técnica para controlar la infestación de insectos. Las plantas transgénicas que producen una o más moléculas pequeñas de ARN en fase que inhiben alguna función biológica esencial en una plaga diana junto con una o más proteínas insecticidas Bt que son tóxicas para la plaga objetivo proporcionan sinergias sorprendentes. Una sinergia es la reducción en el nivel de expresión requerido para el (los) ARN (s) pequeño (s) en fase o la (s) proteína (s) insecticida (s) Bt. Cuando se combinan juntos, se requiere una dosis efectiva menor de cada agente de control de plagas.

Otro ejemplo es un procedimiento para controlar plagas virales de plantas, que incluye proporcionar al menos un ARN pequeño en fase diseñado para silenciar un gen de patógeno vírico y una composición para inducir resistencia mediada por proteína de cubierta viral a la planta (por ejemplo, mediante expresión transgénica del virus proteína de la cubierta en una célula vegetal). En aspectos preferentes, la combinación da como resultado una sinergia entre los dos componentes protectores, de modo que se consigue una dosis eficaz inferior de cada agente de control de patógenos.

Fabricación y uso de construcciones de ADN recombinante

Las construcciones de ADN recombinante de la presente invención se preparan mediante cualquier procedimiento adecuado para la aplicación pretendida, teniendo en cuenta, por ejemplo, el tipo de expresión deseada y la conveniencia de uso en la planta en la que se va a transcribir la construcción. Los procedimientos generales para fabricar y usar constructos de ADN y vectores son bien conocidos en la técnica y se describen en detalle en, por ejemplo, manuales y manuales de laboratorio, que incluyen Sambrook y Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (tercera edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001. Un ejemplo de tecnología útil para construir constructos de ADN y vectores para la transformación se describe en el documento US2004 / 0115642. Las construcciones de ADN también pueden construirse utilizando la tecnología de clonación GATEWAY™ (disponible en Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), que utiliza la reacción de clonación LR recombinasa específica de sitio de la Integrasa /att sistema de construcción del vector del bacteriófago lambda, en lugar de endonucleasas de restricción y ligasas. La reacción de clonación de LR se describe en Las patentes de Estados Unidos 5,888,732 y 6,277,608, y en US2001/283529, US2001/282319 y US2002/0007051. El Manual de instrucciones de la tecnología de clonación GATEWAY™, que también es suministrado por Invitrogen, proporciona instrucciones concisas para la clonación de rutina de cualquier ADN deseado en un vector que comprende elementos de expresión de planta operables. Otro procedimiento alternativo de fabricación de vectores emplea la clonación independiente de la ligadura como se describe por Aslandis et al. (1990) Nucleic Acids Res., 18: 6069-6074 y Rashtchian et al. (1992) Biochem., 206: 91-97, donde un fragmento de ADN con extremos 5' y 3' monocatenarios se hibrida con extremos de cadena sencilla 5' y 3' complementarios de al menos otro fragmento de ADN para producir un vector deseado que luego puede ligarse y amplificarse *en vivo*.

En ciertas realizaciones, la secuencia de ADN de la construcción de ADN recombinante incluye una secuencia que se ha optimizado con codones para la planta en la que se va a expresar la construcción de ADN recombinante. Por ejemplo, una construcción de ADN recombinante para expresar en una planta puede tener todas o partes de su secuencia (por ejemplo, el primer elemento de supresión génica o el elemento de expresión génica) optimizado para codones para la expresión en una planta por procedimientos conocidos en la técnica. Ver, e. gramo., La patente de Estados Unidos 5,500,365, para una descripción de la optimización de codones para plantas; ver también De Amicis y Marchetti (2000) Nucleic Acid Res., 28: 3339-3346.

Fabricación y uso de células vegetales transgénicas y plantas transgénicas

Cuando una construcción de ADN recombinante de la presente invención se usa para producir una célula de planta transgénica no natural, una planta transgénica no natural o una semilla transgénica no natural, la transformación puede incluir cualquiera de los procedimientos y composiciones bien conocidos y demostrados. Los procedimientos adecuados para la transformación de plantas incluyen virtualmente cualquier procedimiento mediante el cual el ADN se puede introducir en una célula, por ejemplo, mediante la administración directa de ADN (p. Ej. Mediante transformación de protoplastos mediada por PEG, mediante electroporación, agitación con fibras de carburo de silicio y aceleración de partículas recubiertas de ADN), por *Agrobacterium* transformación mediada por vectores virales u otros vectores *etc.* Un procedimiento preferente de transformación de plantas es el bombardeo de microproyectiles, por ejemplo, como se ilustra en las patentes de Estados Unidos 5,015,580 (soja), 5,550,318 (maíz), 5,538,880 (maíz), 6,153,812 (wheat), 6,160,208 (maíz), 6,288,312 (arroz) y 6,399,861 (maíz), y 6,403,865 (maíz).

Otro procedimiento preferente de transformación de plantas es *Agrobacterium* transformación mediada. En una realización preferente, la célula de planta transgénica no natural de la presente invención se obtiene mediante transformación por medio de *Agrobacterium* que contiene un sistema de plásmido Ti binario, en el que *Agrobacterium* porta un primer plásmido Ti y un segundo plásmido quimérico que contiene al menos un borde de ADN-T de un plásmido Ti de tipo salvaje, un promotor funcional en la célula de planta transformada y unida operativamente a una construcción de supresión génica de la invención. Véase, por ejemplo, el sistema binario descrito en La patente de Estados Unidos 5,159,135. Ver también De Framond (1983) Biotechnology, 1: 262-269; y Hoekema et al., (1983) Nature, 303: 179. En un sistema binario de este tipo, el plásmido más pequeño, que contiene el borde o las fronteras del ADN-T, puede construirse y manipularse convenientemente en un huésped alternativo adecuado, tal como *E. coli*, y luego transferido a *Agrobacterium*.

Procedimientos detallados para *Agrobacterium* transformación mediada de plantas, especialmente plantas de cultivo, incluye, por ejemplo, procedimientos divulgados en Las patentes de Estados Unidos 5,004,863, 5,159,135, 5,518,908, 5,846,797 y 6,624,344 (cotton); 5,416,011, 5,569,834, 5,824,877, 5,914,451 6,384,306 y 7,002,058 (soja); 5,591,616 5,981,846 y 7,060,876 (maíz); 5,463,174 y 5,750,871 (Brassica, incluyendo colza y rape), y en US2004/0244075 (maíz), US2004/0087030 (cotton) y US2005/0005321 (soja). Procedimientos adicionales para transformación mediada por *Agrobacterium* se divulgan en el documento WO9506722 (maíz). Se han informado procedimientos similares para muchas especies de plantas, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, que incluyen, entre otros, maní (Cheng et al. (1996) Plant Cell Rep., 15: 653); espárragos (Bytebier et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84: 5345); cebada (Wan y Lemaux (1994) Plant Physiol., 104: 37); arroz (Toriyama et al. (1988) Bio / Tecnología, 6:10; Zhang et al. (1988) Plant Cell Rep., 7: 379; trigo (Vasil et al. (1992) Bio / Tecnología, 10: 667; Becker et al. (1994) Plant J., 5: 299), alfalfa (Masoud et al. (1996) Transgen. Res., 5: 313); Brassicas (Radke et al. (1992) Plant Cell Rep., 11: 499-505); y tomate (Sun et al. (2006) Plant Cell Physiol., 47: 426-431) Ver también una descripción de vectores, procedimientos de transformación, y producción de transformadas en plantas

de *Arabidopsis thaliana* en las que los factores de transcripción son expresados constitutivamente por un promotor de CaMV35S, en el documento US2003/0167537. Las células de plantas transgénicas no naturales y las plantas transgénicas también se pueden obtener por transformación con otros vectores, tales como vectores virales (por ejemplo, virus etch poty del tabaco (TEV), virus del mosaico de la raya de cebada (BSMV) y los virus mencionados en Edwardson y Christie, "The Potyvirus Group: Monograph No. 16, 1991, Agric. Exp. Station, Univ. Of Florida), plásmidos, cósmidos, YAC (cromosomas artificiales de levadura), BAC (cromosomas artificiales bacterianos) o cualquier otro vector de clonación adecuado, cuando se usa con un protocolo de transformación apropiado, e. por ejemplo, infección bacteriana (por ejemplo, con *Agrobacterium* como se describió anteriormente), constructos cromosómicos artificiales bacterianos binarios, administración directa de ADN (por ejemplo, mediante transformación mediada por PEG, captación de ADN mediada por desecación / inhibición, electroporación, agitación con fibras de carburo de silicio y bombardeo de microproyectiles). Sería claro para un experto en la técnica que se pueden usar y modificar diversas metodologías de transformación para la producción de plantas transgénicas estables de cualquier número de especies de plantas de interés.

Los procedimientos de transformación para proporcionar células de plantas transgénicas no naturales y plantas transgénicas no naturales que contienen ADN recombinante integrado de forma estable se practican preferentemente en cultivo tisular en medios y en un ambiente controlado. "Medios" se refiere a las numerosas mezclas de nutrientes que se usan para desarrollar células *in vitro*, es decir, fuera del organismo vivo intacto. Los objetivos de las células receptoras incluyen células meristemáticas, callo, embriones inmaduros o partes de embriones, y células gaméticas como microsporas, polen, esperma y óvulos. Cualquier célula a partir de la cual se puede regenerar una planta fértil se contempla como una célula receptora útil para la práctica de la invención. Los callos se pueden iniciar a partir de diversas fuentes de tejidos, incluidos embriones inmaduros o partes de embriones, meristemas apicales de plántulas, microsporas y similares. Esas células que son capaces de proliferar como callo pueden servir como células receptoras para la transformación genética. Se describen procedimientos y materiales de transformación prácticos para preparar plantas transgénicas de la presente invención (por ejemplo, diversos medios y células diana receptoras, transformación de embriones inmaduros y posterior regeneración de plantas transgénicas fértiles), por ejemplo, en patentes de los Estados Unidos. 6,194,636 y 6,232,526 y US2004/0216189.

En la práctica de transformación general, el ADN se introduce en solo un pequeño porcentaje de células diana en cualquier experimento de transformación. Los genes marcadores generalmente se usan para proporcionar un sistema eficiente para la identificación de aquellas células que se transforman establemente al recibir e integrar una construcción de ADN transgénico en sus genomas. Los genes marcadores preferentes proporcionan marcadores selectivos que confieren resistencia a un agente selectivo, tal como un antibiótico o herbicida. Cualquiera de los antibióticos o herbicidas a los que una célula vegetal puede ser resistente puede ser un agente útil para la selección. Las células potencialmente transformadas se exponen al agente selectivo. En la población de células supervivientes se encontrarán aquellas células en las que, generalmente, el gen que confiere resistencia se integra y expresa a niveles suficientes para permitir la supervivencia celular. Las células pueden analizarse más para confirmar la integración estable del ADN recombinante. Los genes marcadores selectivos habitualmente usados incluyen aquellos que confieren resistencia a antibióticos tales como kanamicina o paromomicina (*nptII*), higromicina B (*aph IV*) y gentamicina (*aac3* y *aacC4*) o resistencia a herbicidas como el glufosinato (*bar* o *palmadita*), glifosato (EPSPS) y dicamba. Ejemplos de genes marcadores selectivos útiles y agentes de selección se ilustran en Las patentes de Estados Unidos 5,550,318, 5,633,435, 5,780,706 y 6,118,047. Un gen de resistencia a herbicida particularmente preferente es una glifosato acetil transferasa, descrita como SEQ ID NO. 68 en el documento US2007/0079393. También se pueden emplear marcadores o indicadores seleccionables, tales como marcadores que proporcionan la capacidad de identificar visualmente los transformantes. Los ejemplos no limitantes de marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, un gen que expresa una proteína que produce un color detectable al actuar sobre un sustrato cromogénico (por ejemplo, *beta*-glucuronidasa (GUS) (*uidA*) o luciferasa (*luc*) o que sí mismo es detectable, como la proteína verde fluorescente (GFP) (*gfp*) o una molécula inmunogénica. Los expertos en la materia reconocerán que muchos otros marcadores o informadores útiles están disponibles para su uso.

La detección o medición de la transcripción de la construcción de ADN recombinante en la célula de planta transgénica no natural de la invención se puede lograr mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo procedimientos de detección de proteínas (por ejemplo, transferencias Western, ELISA y otros procedimientos inmunoquímicos), mediciones de actividad enzimática, o procedimientos de detección de ácidos nucleicos (por ejemplo, Southern blots, Northern blots, PCR, RT-PCR, hibridación fluorescente *in situ*). Dichos procedimientos son bien conocidos por los expertos en la materia como se evidencia por los numerosos manuales disponibles; véase, por ejemplo, Joseph Sambrook y David W. Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (tercera edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001; Frederick M. Ausubel y otros (editores) "Short Protocols in Molecular Biology" (quinta edición), John Wiley and Sons, 2002; John M. Walker (editor) "Protein Protocols Handbook" (segunda edición), Humana Press, 2002; y Leandro Peña (editor) "Plantas transgénicas: procedimientos y protocolos", Humana Press, 2004.

Otros procedimientos adecuados para detectar o medir la transcripción de la construcción de ADN recombinante en la célula de planta transgénica no natural de la invención incluyen la medición de cualquier otro rasgo que sea una indicación directa o indirecta de supresión del gen diana en la célula vegetal transgénica en la que la construcción de ADN recombinante se transcribe, con relación a una en la que el ADN recombinante no se transcribe, e. g., rasgos

morfológicos macroscópicos o microscópicos, tasas de crecimiento, rendimiento, tasas reproductivas o de reclutamiento, resistencia a plagas o patógenos o resistencia al estrés biótico o abiótico (por ejemplo, estrés hídrico, estrés salino, estrés por nutrientes, calor o frío). Dichos procedimientos pueden usar mediciones directas de un rasgo fenotípico o ensayos proxy (por ejemplo, en plantas, estos ensayos incluyen ensayos de partes de plantas tales como ensayos de hojas o raíces para determinar la tolerancia al estrés abiótico). Los procedimientos incluyen medidas directas de resistencia a la plaga de invertebrados (por ejemplo, daño a tejidos de plantas) o ensayos indirectos (por ejemplo, ensayos de rendimiento de plantas, o bioensayos tales como el gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) bioensayo larval descrito en WO2005/110068 y US2006/0021087, o el bioensayo de nematodos del quiste de soja descrito por Steeves et al. (2006) *Funct. Plant Biol.*, 33: 991-999, donde se miden quistes por planta, quistes por raíz de gramo, huevos por planta, huevos por raíz de gramo y huevos por quiste.

Las construcciones de ADN recombinante de la invención pueden apilarse con otro ADN recombinante para impartir rasgos adicionales (por ejemplo, en el caso de plantas transformadas, rasgos que incluyen resistencia a herbicidas, resistencia a plagas, tolerancia a la germinación en frío, tolerancia al déficit de agua y similares) por ejemplo, al expresar o suprimir otros genes. Las construcciones para la disminución y el aumento coordinados de la expresión génica se describen en el documento US2004/0126845.

Las semillas de plantas fértiles transgénicas se pueden cosechar y usar para cultivar generaciones de progenie, incluidas las generaciones híbridas, de plantas transgénicas no naturales de la presente invención que incluyen la construcción de ADN recombinante en su genoma. Por lo tanto, además de la transformación directa de una planta con una construcción de ADN recombinante de la presente invención, se pueden preparar plantas transgénicas no naturales de la invención cruzando una primera planta que tiene el ADN recombinante con una segunda planta que carece de la construcción. Por ejemplo, el ADN recombinante puede introducirse en una línea de planta que es susceptible de transformación para producir una planta transgénica, que puede cruzarse con una segunda línea de planta para introgresar el ADN recombinante en la progenie resultante. Una planta transgénica de la invención puede cruzarse con una línea de planta que tiene otro ADN recombinante que confiere uno o más rasgos adicionales (tales como resistencia a herbicidas, resistencia a plagas o enfermedades, resistencia al estrés ambiental, contenido de nutrientes modificado y mejora del rendimiento) para producir plantas de progenie que tienen ADN recombinante que confiere tanto el comportamiento de expresión de secuencia objetivo deseado como el (los) rasgo (s) adicional (es).

Típicamente, en dicha reproducción para combinar rasgos, la planta transgénica que dona el rasgo adicional es una línea masculina y la planta transgénica que tiene los rasgos base es la línea femenina. La progenie de esta segregación cruzada tal que algunas de las plantas llevarán el ADN para ambos rasgos parentales y algunas llevarán ADN para un rasgo parental; tales plantas pueden identificarse por marcadores asociados con ADN recombinante parental. Las plantas progenie que llevan ADN para ambos rasgos parentales se pueden cruzar de nuevo en la línea parental femenina múltiples veces, e. por ejemplo, generalmente de 6 a 8 generaciones, para producir una planta de progenie con sustancialmente el mismo genotipo que una línea parental transgénica original, pero para el ADN recombinante de la otra línea parental transgénica.

Otro aspecto más es una planta transgénica no natural cultivada a partir de la semilla transgénica no natural descrita en el presente documento. La presente invención contempla plantas transgénicas cultivadas directamente a partir de semillas transgénicas que contienen el ADN recombinante así como generaciones de plantas de progenie, incluyendo líneas de plantas endogámicas o híbridas, hechas cruzando una planta transgénica cultivada directamente de semilla transgénica a una segunda planta no cultivada del mismo transgénico semilla.

El cruce puede incluir, por ejemplo, los siguientes pasos: (a) plantar semillas de la primera planta parental (por ejemplo, no transgénicas o transgénicas) y una segunda planta parental que es transgénica de acuerdo con la invención; (b) cultivar las semillas de la primera y la segunda plantas parentales en plantas que lleven flores; (c) polinizar una flor del primer progenitor con polen del segundo progenitor; y (d) cosechar las semillas producidas en la planta parental portadora de la flor fertilizada.

A menudo es deseable introgresar el ADN recombinante en variedades de elite, *mi. gramo.*, por retrocruzamiento, para transferir un rasgo deseable específico de una fuente a una endogámica u otra planta que carece de ese rasgo. Esto se puede lograr, por ejemplo, al cruzar primero una endogamia superior ("A") (progenitor recurrente) con una endocriada donante ("B") (progenitor no recurrente), que porta el / los gen (es) apropiado (s) para el rasgo en cuestión, por ejemplo, una construcción preparada de acuerdo con la presente invención. La progenie de este cruce primero se selecciona en la progenie resultante para el rasgo deseado que se transferirá desde el padre "B" no recurrente, y luego la progenie seleccionada se acopla de nuevo al padre "A" superior recurrente. Después de cinco o más generaciones de retrocruzamiento con selección para el rasgo deseado, la progenie es hemicigóptica para los loci que controlan la característica que se transfiere, pero son como el progenitor superior para la mayoría o para casi todos los otros genes. La última generación de retrocruzamiento sería autofecundada para proporcionar una progenie que sea de reproducción pura para el (los) gen (es) que se está (n) transfiriendo. *yo. mi.*, uno o más eventos de transformación.

A través de una serie de manipulaciones de reproducción, una construcción de ADN seleccionada puede moverse de una línea a una línea completamente diferente sin la necesidad de una manipulación recombinante adicional. De este modo, se pueden producir plantas endogámicas que son verdaderas crías para uno o más constructos de ADN. Al cruzar diferentes plantas endogámicas, se puede producir una gran cantidad de híbridos diferentes con diferentes combinaciones de construcciones de ADN. De esta manera, se pueden producir plantas que tienen las propiedades agronómicas deseables frecuentemente asociadas con híbridos ("vigor híbrido"), así como las características deseables impartidas por uno o más constructos de ADN.

Los marcadores genéticos pueden usarse para ayudar en la introgresión de uno o más constructos de ADN de la invención de un fondo genético a otro. La selección asistida por marcador ofrece ventajas en relación con la mejora convencional, ya que se puede utilizar para evitar errores causados por variaciones fenotípicas. Además, los marcadores genéticos pueden proporcionar datos con respecto al grado relativo de germoplasma de élite en la progenie individual de una cruce particular. Por ejemplo, cuando una planta con un rasgo deseado que de otro modo tiene un fondo genético no agronómicamente deseable se cruza con un padre de élite, los marcadores genéticos pueden usarse para seleccionar una progenie que no solo posea el rasgo de interés, sino que también tenga un tamaño relativamente grande. proporción del germoplasma deseado De esta forma, se minimiza el número de generaciones requeridas para intrigar uno o más rasgos en un fondo genético particular. La utilidad de la selección asistida por marcador en la cría de plantas transgénicas no naturales de la presente invención, así como los tipos de marcadores moleculares útiles, tales como SSR y SNP, se discuten en los documentos WO 02/062129, US2002/0133852, US2003/0049616 y US2003/0005491.

En ciertas células de plantas transgénicas no naturales y plantas transgénicas no naturales de la invención, puede ser deseable expresar simultáneamente (o suprimir) un gen de interés mientras también se regula la expresión de un gen diana. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la planta transgénica contiene ADN recombinante que incluye una unidad de transcripción transgénica para expresar al menos un gen de interés y un elemento de supresión génica para suprimir un gen diana.

Por lo tanto, como se describe en el presente documento, las células de plantas transgénicas no naturales o plantas transgénicas no naturales se pueden obtener mediante el uso de cualquier procedimiento de transformación transitorio o estable, integrativo o no integrativo conocido en la técnica o divulgado actualmente. Las construcciones de ADN recombinante pueden transcribirse en cualquier célula o tejido vegetal o en una planta completa de cualquier etapa de desarrollo. Las plantas transgénicas pueden derivarse de cualquier planta de monocotiledóneas o dicotiledóneas, como plantas de interés comercial o agrícola, como plantas de cultivo (especialmente plantas cultivadas utilizadas para alimentación humana o animal), madera, fibra, pulpa o celulosa. produciendo árboles y plantas, plantas vegetales, plantas frutales y plantas ornamentales. Los ejemplos no limitantes de plantas de interés incluyen plantas de cultivo de granos (tales como trigo, avena, cebada, maíz, centeno, triticale, arroz, mijo, sorgo, quinoa, amaranto y alforfón); plantas de cultivo de forraje (tales como hierbas forrajeras y dicotiledóneas de forraje incluyendo alfalfa, veza, trébol y similares); plantas de semillas oleaginosas (como algodón, cártamo, girasol, soja, colza, colza, lino, maní y palma de aceite); nueces de árbol (tales como nuez, anacardo, avellana, nuez, almendra, macadamia, y similares); caña de azúcar, coco, palma datilera, aceituna, remolacha azucarera, té y café; árboles y plantas que producen madera, fibra, pulpa o celulosa (por ejemplo, algodón, lino, yute, ramio, sisal, kenaf, switchgrass y bambú); plantas de cultivos de hortalizas, tales como legumbres (por ejemplo, frijoles, guisantes, lentejas, alfalfa, maní), lechuga, espárrago, alcachofa, apio, zanahoria, rábano, mandioca, batata, ñame, cacao, café, té, las brasicas (para ejemplo, coles, col rizada, mostaza y otras brassicas de hoja, brócoli, coliflor, coles de Bruselas, nabo, colirrábano), cucurbitáceas comestibles (por ejemplo, pepinos, melones, calabazas de verano, calabazas de invierno), alliums comestibles (por ejemplo, cebollas, ajo, puerros, chalotes, cebollinos), miembros comestibles de las solanáceas (por ejemplo, tomates, berenjenas, patatas, pimientos, mollejas) y miembros comestibles de las Chenopodiaceae (por ejemplo, remolacha, acelga, espinaca, quinoa, amaranto); plantas frutales tales como manzana, pera, cítricos (por ejemplo, naranja, lima, limón, pomelo y otros), frutas de hueso (por ejemplo, albaricoco, melocotón, ciruela, nectarina), plátano, piña, uva, kiwi, papaya, aguacate, higo, mango y bayas; y plantas ornamentales que incluyen plantas con flores ornamentales, árboles y arbustos ornamentales, cubiertas ornamentales y hierbas ornamentales. Las plantas dicotiledóneas preferentes incluyen canola, brócoli, col, zanahoria, coliflor, repollo chino, pepino, frijoles secos, berenjena, hinojo, alubias, calabazas, lechugas, melones, okra, guisantes, pimientos, calabaza, rábanos, espinacas, calabaza, sandía, algodón, papa, quinoa, amaranto, trigo sarraceno, cártamo, soja, remolacha azucarera y girasol. Las monocotiledóneas preferentes incluyen trigo, avena, cebada, maíz (incluido maíz dulce y otras variedades), centeno, triticale, arroz, hierbas ornamentales y forrajeras, sorgo, mijo, cebollas, puerros y caña de azúcar, más preferentemente maíz, trigo y arroz.

El objetivo final en la transformación de plantas es producir plantas que sean útiles para el hombre. A este respecto, las plantas transgénicas no naturales de la invención se pueden usar virtualmente para cualquier propósito que se considere valioso para el productor o el consumidor. Por ejemplo, uno puede desear cosechar la planta transgénica en sí, o cosechar semillas transgénicas de la planta transgénica para propósitos de plantación, o se pueden hacer productos a partir de la planta transgénica o sus semillas tales como aceite, almidón, etanol u otros productos de fermentación, animales piensos o alimentos para humanos, productos farmacéuticos y diversos productos industriales. Por ejemplo, el maíz se usa ampliamente en las industrias de alimentos y piensos, así como en aplicaciones industriales. Se puede encontrar un análisis más detallado de los usos del maíz, por ejemplo, en Las patentes de Estados Unidos 6,194,636, 6,207,879, 6,232,526, 6,426,446, 6,429,357, 6,433,252, 6,437,216 y

6,583,338, WO 95/06128 y WO 02/057471. Por lo tanto, también se describen productos básicos producidos a partir de una planta, planta o semilla de plantas transgénicas no naturales de la presente invención, incluyendo hojas, raíces, brotes, tubérculos, tallos, frutos, semillas u otras partes de una planta, harinas, aceites, extractos, productos de fermentación o digestión, granos triturados o enteros o semillas de una planta, o cualquier producto alimenticio o no alimenticio que incluye tales productos básicos producidos a partir de una planta, planta o semilla de una planta transgénica de la presente invención. La detección de una o más de las secuencias de ácido nucleico de las construcciones de ADN recombinante de la presente invención en uno o más productos básicos o productos básicos contemplados en el presente documento es *de facto* evidencia de que el producto básico o producto básico contiene o deriva de una célula, planta o semilla de una planta transgénica de la presente invención.

5 En realizaciones preferentes, la planta transgénica no natural preparada a partir de la célula de planta transgénica no natural de la presente invención, i. e., una planta transgénica que tiene en su genoma una construcción de ADN recombinante de la presente invención tiene al menos un rasgo alterado adicional, en relación con una planta que carece de la construcción de ADN recombinante, seleccionada del grupo de rasgos que consisten en: (a) estrés abiótico mejorado tolerancia; (b) tolerancia mejorada al estrés biótico; (c) composición del metabolito primario modificado; (d) composición de metabolitos secundarios modificada; (e) oligoelemento modificado, carotenoide o composición vitamínica; (f) rendimiento mejorado; (g) una mejor capacidad para usar nitrógeno u otros nutrientes; (h) características agronómicas modificadas; (i) crecimiento modificado o características reproductivas; y (j) mejor calidad de cosecha, almacenamiento o procesamiento.

10 En realizaciones particularmente preferentes, la planta transgénica no natural se caracteriza por: tolerancia mejorada al estrés abiótico (por ejemplo, tolerancia al déficit hídrico o sequía, calor, frío, niveles de sal o nutrientes no óptimos, niveles de luz no óptimos) o de estrés biótico (por ejemplo, hacinamiento, alelopatía o heridas); mediante una composición de metabolito primario modificado (por ejemplo, ácido graso, aceite, aminoácido, proteína, azúcar o carbohidrato); una composición de metabolito secundario modificado (por ejemplo, alcaloides, terpenoides, policétidos, péptidos no ribosómicos y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto); un elemento traza modificado (por ejemplo, hierro, zinc), carotenoide (por ejemplo, *beta*-caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina u otros carotenoides y xantofilas) o composición de vitaminas (por ejemplo, tocoferoles); rendimiento mejorado (por ejemplo, rendimiento mejorado en condiciones sin estrés o rendimiento mejorado bajo estrés biótico o abiótico); capacidad mejorada para usar nitrógeno u otros nutrientes; características agronómicas modificadas (por ejemplo, maduración tardía, senescencia retrasada, madurez anterior o posterior, tolerancia mejorada a la sombra, resistencia mejorada al alojamiento de raíces o tallos, resistencia mejorada al tallo verde de los tallos, respuesta modificada al fotoperíodo); crecimiento modificado o características reproductivas (por ejemplo, enanismo intencional, esterilidad masculina intencional, útil, por ejemplo, en procedimientos de hibridación mejorados, tasa de crecimiento vegetativo mejorada, germinación mejorada, fertilidad mejorada de machos o hembras); una mejor calidad de cosecha, almacenamiento o procesamiento (por ejemplo, mejor resistencia a las plagas durante el almacenamiento, mayor resistencia a la rotura, mejor atractivo para los consumidores); o cualquier combinación de estos rasgos.

15 En un aspecto preferente descrito en la presente memoria, la semilla transgénica no natural, o la semilla producida por la planta transgénica no natural, tiene una composición de metabolito primario modificado (por ejemplo, ácidos grasos, aceite, aminoácidos, proteínas, azúcar o carbohidratos), un metabolitos secundarios (por ejemplo, alcaloides, terpenoides, policétidos, péptidos no ribosómicos y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto), un elemento traza modificado (por ejemplo, hierro, zinc, azufre), fosfato orgánico (por ejemplo, ácido fítico), carotenoide (por ejemplo, *beta*-caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina u otros carotenoides y xantofilas), o la composición de vitaminas (por ejemplo, tocoferoles), una cosecha mejorada, almacenamiento o calidad de procesamiento, o una combinación de estos. Por ejemplo, puede ser deseable modificar el aminoácido (por ejemplo, lisina, metionina, triptófano o proteína total), aceite (por ejemplo, composición de ácidos grasos o aceite total), carbohidratos (por ejemplo, azúcares simples o almidones), oligoelemento, carotenoides o contenido vitamínico de semillas de plantas de cultivo (por ejemplo, canola, algodón, cártamo, soja, remolacha azucarera, girasol, trigo, maíz o arroz), preferentemente en combinación con una cosecha mejorada, almacenamiento o calidad de procesamiento, y por lo tanto proporcionar semillas mejoradas para su uso en alimentos para animales o humanos. En otro ejemplo, puede ser deseable modificar la cantidad o calidad de polisacáridos (por ejemplo, almidón, celulosa o hemicelulosa) en tejidos vegetales para uso en alimentos para animales o alimentos para humanos o para la fermentación o producción de biocombustibles. En otro caso, puede ser deseable cambiar los niveles de componentes nativos de la planta o semilla transgénica de una planta transgénica, por ejemplo, para disminuir los niveles de proteínas con bajos niveles de lisina, metionina o triptófano, o para aumentar los niveles de un aminoácido o ácido graso deseado, o para disminuir los niveles de una proteína alergénica o glicoproteína (por ejemplo, alérgenos de maní incluyendo ara h 1, alérgenos de trigo incluyendo gliadinas y gluteninas, alérgenos de soja como alérgeno P34, globulinas, glicininas y conglucinininas) o de un metabolito tóxico (por ejemplo, glucósidos cianogénicos en la yuca, alcaloides de la solanácea en los miembros de las solanáceas). Las realizaciones de los siguientes Ejemplos que no caen dentro del alcance de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo describe el ADN que codifica un transcrito que se pliega en ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños para la supresión génica. Más específicamente, este ejemplo proporciona secuencias de ácidos nucleicos, obtenidas a partir de plantas de cultivo de monocotiledóneas, que son útiles para hacer una única molécula de ADN recombinante que codifica un transcrito que se pliega en ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños para la supresión génica, independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN.

Varias bibliotecas de ARN se clonaron a partir de arroz maduro (*Oryza sativa*) grano y de varios maíces (*Zea mays*) tejidos mediante secuenciación de alto rendimiento (Margulies et al. (2005) Nature, 437: 376-380) Entre las secuencias más abundantes clonadas de grano de arroz maduro y raíz de maíz, 32 DAP (días después de las polinizaciones) y 39 granos DAP fueron siete ARN de 21 mer (**SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, y SEQ ID NO. 7**), listado en **Tabla 1**.

Tabla 1

SEQ ID NO.	Número de clon	Secuencia de ADN	Especie / Tejido*
1	141121	ATGCAAGTGATGTA GCGCCCC	grano de arroz, raíz de maíz, grano de maíz 32DAP y 39DAP
2	297263	ATATAGGAGTCACTC AGGAAA	grano de arroz, grano de maíz 32 DAP
3	1196700	TCTTTGCCCTCTTTA GTGCTT	grano de arroz, grano de maíz 32DAP
4	880479	TATGGATGGGCACC ATCTTCA	grano de arroz, grano de maíz 32 DAP
5	1275002	TGGCCACCAACAAC ATCAGCA	grano de arroz, grano de maíz 32DAP
6	1379342	TGCCCCACCAAGAG AACGCCG	grano de arroz, raíz de maíz, hoja de maíz, grano de maíz 32DAP y 39DAP
7	544819	TGCCTGAGGAACAC CACCAGG	grano de arroz, raíz de maíz, grano de maíz 32DAP y 39DAP
* DAP, días después de la polinización			

Estos siete ARN de 21 unidades, cuando se alinearon con el genoma del arroz en el locus Os6g21900, se localizaron en dos regiones adyacentes que contenían siete y seis ARNip de 21 nt alineados de extremo a extremo, respectivamente, y formando una estructura replegada única representada en la figura 1. No hay ARNip de este gen estaban presentes en otras bibliotecas, y solo un número muy pequeño se secuenciaron a partir de la región de bucle putativo entre los brazos de la estructura replegada. Los resultados de secuenciación adicionales indicaron que esta estructura replegada contenía al menos otros tres ARN potenciales de 21 meros (en fase con y distal a los primeros siete 21-mers y bucle), aunque se predijo que los ARN pequeños resultarían de *in vivo* la escisión de estos ARN bicatenarios pequeños en fases adicionales se clonó solo a bajas abundancias.

Aunque se identificaron muchas variantes de ARN pequeños, solo una única fase única de 21 nucleótidos (21 nt) de la cadena positiva fue respaldada por la información de secuencia (**Tabla 2**) La "plenitud de fase" indica cuántas fases de 21 nt están ocupadas por ARN pequeños secuenciados en ambas cadenas; por ejemplo, una plenitud de 0.5 para la trama 7.0 con una longitud de fase de 8 indica que las ocho tramas de 21 nt están ocupadas en la cadena positiva, pero ninguna está ocupada en la cadena negativa hipotética. La "unicidad de fase" representa un puntaje de probabilidad para ARN pequeños en fases, que tiene en cuenta la ocupación de fase y la abundancia de ARN pequeños en cada fase. El marco 16.1 y el marco 7.0 representan cada lado de la estructura replegada (representada en la figura 1, con los primeros siete pequeños ARN en fase mostrados) y sus abundantes ARN pequeños en fase; la fase es muy compatible (unicidad > 0,97) para esta estructura, mientras que todas las demás fases potenciales de ARN pequeño no se soportaron suficientemente por los datos de secuencia (unicidad < 0,005).

Tabla 2

Marco	Inicio (número de fase)	Longitud de fase	Fase de plenitud	Unicidad de fase	Abundancia de ARN pequeño	Copias promedio
16,1	5099(1), 5120(2), 5141(3), 5162(4), 5183(5), 5204(6), 5246(8)	8	0,43	0,9963	344, 89484, 3393, 3121, 10455, 71, 31	15271
7,0	3620(1), 3641(2), 3662(3), 3683(4), 3704(5), 3725(6), 3746(7), 3767(8)	8	0,5	0,9717	67, 6875, 1289, 3, 151, 7, 67, 11619	2510
19,0	3611(1), -3630(2), -3651(3), 3653(3), -3693(5), -3714(6), -3735(7), 3737(7), -3756(8), 3758(8)	8	0,62	0,0049	27, 1, 1, 59, 1, 3, 6, 2, 1, 1	10
16,0	3629(1), 3650(2), 3671(3), -3711(5), 3713(5)	5	0,5	0,0013	1, 5, 2, 2, 2	2
4,0	3638(1), 3680(3), 3722(5), -3741(6), 3764(7)	7	0,35	0,0011	17, 1, 2, 2, 1	5
18,0	-5120(1), 5122(1), -5141(2), 5164(3), 5185(4)	4	0,62	0,001	1, 15, 1, 73, 17	21
6,0	3640(1), 3661(2), 3682(3), 3724(5), 3745(6), 3766(7)	7	0,42	0,0008	9, 3, 1, 1, 2, 2	3
15,0	5140(1), 5161(2), 5182(3), 5203(4)	4	0,5	0,0007	1, 71, 4, 4	20
14,0	3669(1), 3711(3), 3753(5)	5	0,3	0,0006	1, 6, 1	3
11,0	5199(1), 5220(2), 5262(4)	4	0,37	0,0004	1, 3, 1	2
20,0	3654(1), 3675(2), -3736(5), 3780(7)	7	0,28	0,0003	2, 2, 1, 2	2
3,0	3637(1), 3658(2), 3700(4), 3721(5), -3740(6)	6	0,41	0,0003	2, 1, 2, 1, 1	1

La secuencia genómica y los precursores putativos para la estructura replegada de *Oryza sativa* se da en las **SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, y SEQ ID NO. 11**. Una secuencia de ADN genómico (**SEQ ID NO. 9**) Se predijo que incluiría la secuencia de ADNc, la secuencia intrónica y los brazos replegados como se muestra en la figura 2, y varias versiones empalmadas alternativamente de esta transcripción se encontraron en las bases de datos de ADNc. Una abundante transcripción empalmada alternativamente (**SEQ ID NO. 10**) indica la eliminación de la mitad de la estructura replegada, probablemente evitando la producción de ARN pequeño. Una etiqueta de secuencia expresada (**SEQ ID NO. 11**) se identificó como la representación de la secuencia complementaria a **SEQ ID NO. 10**. Una caja CANATA canónica (indicada por los nucleótidos en caja en la figura 2) se encuentra 34 bases aguas arriba del sitio de inicio de transcripción predicho en **SEQ ID NO. 8**, evidencia de que este es el *De buena fe* 5' fin de la transcripción. De este modo, una estructura replegada única se transcribe desde un promotor y forma, independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN, el ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños para la supresión génica. Alternativamente, dos (o más) variantes de corte y empalme transcritas del mismo promotor, cada una contiene uno de cada uno de los brazos de la estructura replegada, y se unen en *trans*, independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN, para formar el ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN pequeños de doble cadena.

La evidencia recolectada apoya este locus como un nuevo tipo de elemento regulatorio (supresión) mediado por ARN. diferente a *trans*-activos ARNip, todos los múltiples pequeños ARN bicatenarios se derivan de la transcripción de ARN original o más cadena del precursor, independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN y sin un sitio diana de miARN que inicia la producción de ARN bicatenario. A diferencia de los microARN, el locus está escindido *in vivo* a múltiples ARN pequeños en fase abundante, y (como se describe a continuación en el Ejemplo 5), este procedimiento requiere DCL4 (o un ortólogo DCL4) y no DCL1. Por lo tanto, los inventores denominan este locus novedoso como un locus de "ARN pequeño en fase".

La expresión de este locus de ARN pequeño en fase particular parece estar restringida principalmente al grano maduro tanto en maíz como en arroz, lo que indica una función endógena relacionada con la represión de los genes implicados en la maduración o mantenimiento del estado embriogénico en el grano maduro. Se predijeron objetivos putativos para cada uno de los siete ARN pequeños en fases (**SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, y SEQ ID NO. 7**), siguiendo las pautas de predicción objetivo descritas en Allen et al. (2005) Cell, 121: 207-221. Ejemplos no limitantes de estos objetivos, que incluyen miembros de la familia de transportadores de potasio de alta afinidad HAK2, se proporcionan en **Tabla 3**; los loci de maíz correspondientes de la base de datos pública, Maize Assembled Genomic Island (disponible en línea en magi.plantgenomics.iastate.edu, ver Fu et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 102: 12282-12287) también se proporcionan.

Tabla 3

SEQ ID NO.	Número de clon	Secuencia de ADN	Gen diana (arroz)	Locus de maíz *	Valor E
3	1196700	TCTTTGCCCTCT TTAGTGCTT	Dominio de proteína quinasa Os01g12300	MAGI4_89402	3,00E-24
				MAGI4_122217	7,00E-19
				MAGI4_104144	1,00E-17
				MAGI4_99444	1,00E-14
				MAGI4_39748	2,00E-14
				MAGI4_22926	3,00E-14
			Cadena pesada de miosina Os12g17310	MAGI4_70672	0
MAGI4_141564	0				
5	1275002	TGGCCACCAAC AACATCAGCA	Transportador de tipo ABC-2 Os09g29660	MAGI4_27534	2,00E-22
			Transportador de potasio 7 Os01g70940	MAGI4_99444	0
			Proteína de absorción de potasio Os09g27580	MAGI4_99444	3,00E-68
			Proteína del canal de cloruro Os08g38980	MAGI4_25450	e-127
* disponible públicamente en magi.plantgenomics.iastate.edu					

Ejemplo 2

Este ejemplo describe una construcción de ADN recombinante que incluye un promotor ligado operablemente a ADN que transcribe ARN que incluye: (a) al menos un sitio de reconocimiento exógeno reconocible por un ARN pequeño en fase expresado en una célula específica de un eucariota multicelular, y (b) diana ARN que se va a suprimir en la célula específica, en el que el ARN diana debe expresarse en células del eucariota multicelular distintas de la célula específica. Más específicamente, este ejemplo describe una construcción de ADN recombinante que incluye ADN que transcribe ARN que contiene un sitio de reconocimiento exógeno que corresponde a al menos un ARN pequeño en fase derivado de un locus de ARN pequeño en fase endógeno.

Las construcciones de ADN recombinante se diseñaron para incluir un elemento de expresión génica para la expresión de un gen de interés (en este ejemplo no limitante, el gen indicador, *beta*-glucuronidasa, "GUS"), y un sitio de reconocimiento (sitio diana) correspondiente a al menos un ARN pequeño en fase de la presente invención (por ejemplo, uno o más de **SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, y SEQ ID NO. 7** como se describe en el Ejemplo 1). Se pueden diseñar construcciones de ADN recombinante similares, en las que se incluye un sitio de reconocimiento (sitio diana) correspondiente a al menos un ARN pequeño en fase de la presente invención para regular la expresión de un elemento de expresión génica para la expresión de un gen de interés (que puede ser secuencia traducible o codificante o secuencia no codificadora, incluida la secuencia reguladora), e. g., los descritos bajo el encabezado "Genes diana", o alternativamente para regular la expresión de un elemento de supresión génica (por ejemplo, sentido, antisentido, combinaciones de sentido y antisentido, repeticiones en tándem de sentido o de antisentido), microARN, ARNip y cualquier otra construcción

diseñada para reducir la expresión de un gen diana).

Una construcción de control (pMON94320) con un promotor 35S que dirige la expresión de GUS y un terminador Hsp17 incluye la secuencia parcial **SEQ ID NO. 12**, con un sitio de inserción (indicado en letra negrita en la figura **3B**) localizado entre la secuencia de codificación GUS y el terminador Hsp17. Se diseñaron tres constructos adicionales basados en esta construcción de control, conteniendo cada uno al menos un sitio de reconocimiento correspondiente a un ARN pequeño en fase de la presente invención. La primera construcción (pMON100574) incluyó la secuencia parcial **SEQ ID NO. 13**, que contenía uno de los ARN pequeños en fase de 21 meros (**SEQ ID NO. 6**) descrito en el Ejemplo 1, incorporado en la orientación de sentido en el sitio de inserción (**Figura 3C**). La segunda construcción (pMON100575) incluyó la secuencia parcial **SEQ ID NO. 14**, que contenía uno de los ARN pequeños en fase de 21 meros (**SEQ ID NO. 6**) descrito en el Ejemplo 1, incorporado en la orientación antisentido (es decir, como un sitio de reconocimiento correspondiente a **SEQ ID NO. 6** en la orientación de sentido) en el sitio de inserción (**Figura 3D**). La tercera construcción (pMON100576) incluyó la secuencia parcial **SEQ ID NO. 15**, que contenía dos de los ARN pequeños en fase de 21 meros (**SEQ ID NO. 5** y **SEQ ID NO. 6**) descrito en el Ejemplo 1, ambos incorporados en la orientación antisentido (es decir, como sitios de reconocimiento correspondientes a **SEQ ID NO. 5** y **SEQ ID NO. 6** en la orientación de sentido) en el sitio de inserción (**Figura 3E**).

El tejido de maíz de los granos en desarrollo se analizó por transferencia Northern usando una sola sonda con la secuencia CGGCGTTCTTGGTGGGCA (**SEQ ID NO. 16**, yo. e., la secuencia antisentido de **SEQ ID NO. 6**). Los resultados, representados en la figura 4, indicó la transcripción del locus de ARN pequeño en fase de maíz endógeno, especialmente en embriones en desarrollo y en menor medida en endospermas en desarrollo, corroborando aún más los resultados de clonación dados en **Tabla 1**.

Los embriones zigóticos de maíz (21-22 días después de la polinización) se transformaron con los constructos de ADN recombinante mediante bombardeo de partículas, usando aproximadamente 0,5 microgramos de ADN administrados con una inyección de una pistola de partículas de helio. El tejido bombardeado se incubó durante 24 o 48 horas en una cámara oscura de crecimiento a una temperatura de 26 grados Celsius. Los embriones se tiñeron en solución de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónico (24 horas a 37 grados Celsius) seguido de la limpieza del tejido teñido en etanol al 70 %. La expresión del gen de interés (GUS) codificado por el elemento de expresión génica se indicó por el nivel de tinción en los embriones; Se predijo que la expresión de GUS sería silenciada por el locus de ARN pequeño en fase endógena de maíz. Como se predijo, la expresión de GUS se silenció en los embriones transformados con las construcciones (pMON100575 y pMON100576) que contenían al menos un sitio de reconocimiento correspondiente a un ARN pequeño en fase de la presente invención. (**Figura 3A**). El silenciamiento observado en los embriones transformados con pMON100574 se debió presumiblemente a la transcripción endógena antisentido presente en baja abundancia como se observó en las bibliotecas de ARN de arroz clonado (ver **Tabla 2** para abundancias de ARN pequeños clonados).

Los sitios de reconocimiento correspondientes a ARN pequeños en fase son útiles para regular la expresión de un transgén en una construcción que incluye al menos un sitio de reconocimiento de este tipo. Por lo tanto, esta memoria descriptiva proporciona una construcción de ADN recombinante que incluye un promotor unido operativamente al ADN que transcribe a ARN que incluye: (a) al menos un sitio de reconocimiento exógeno reconocible por un ARN pequeño en fase expresado en una célula específica de un eucariota multicelular, y) el ARN objetivo se suprime en la célula específica, en el que el ARN diana debe expresarse en células del eucariota multicelular distintas de la célula específica. La memoria descriptiva incluye una construcción de ADN recombinante que incluye un transgén y al menos un sitio de reconocimiento que corresponde a uno o más ARN pequeños en fase de la presente invención, útiles para la expresión de ese transgén en tejidos distintos de aquellos en los que se expresan los ARN pequeños en fase, y supresión del transgén en los tejidos donde se expresan los ARN pequeños en fase. Por ejemplo, **SEQ ID NO. 6** se ha demostrado que se expresa en el grano de arroz (**Ejemplo 1**) y en el grano de maíz (este ejemplo); una construcción que contiene un transgén (por ejemplo, un gen de tolerancia a herbicidas tal como 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa) y al menos un sitio de reconocimiento correspondiente a **SEQ ID NO. 6** es útil para la supresión del transgén en al menos arroz o maíz.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe una construcción de ADN recombinante que incluye ADN que transcribe a: (a) una primera serie de segmentos de ARN contiguos, y (b) una segunda serie de segmentos de ARN contiguos, en donde la primera serie de segmentos de ARN contiguos hibrida *in vivo* a la segunda serie de segmentos de ARN para formar ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños ("ARN pequeños en fase") para la supresión génica. Preferentemente, el ARN hibridado se produce independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN. La construcción de ADN recombinante de la presente invención puede incluir un locus de ARN pequeño en fase sintética (que puede transcribirse en un transcrito más larga o más corta que la transcrita a partir de un locus de ARN pequeño en fase de origen natural), diseñado para escindirse *in vivo* y en fase en cualquier número de ARN pequeños en fases para la supresión de uno o más genes diana.

Este ejemplo proporciona un aspecto de una construcción de ADN recombinante que incluye secuencias de ácido nucleico derivadas de plantas de cultivo de monocotiledóneas, que transcribe a un ARN que contiene una estructura plegada individual escindible *in vivo* y en fase a múltiples ARN bicatenarios pequeños para la supresión génica,

independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN. Se descubrió que un locus pequeño de ARN en fases de monocotiledóneas tiene la estructura replegada única representada en la figura 1 (ver **Ejemplo 1**). Este locus incluye al menos siete ARN de 21 meros (**SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, y SEQ ID NO. 7**), cada uno de los cuales puede diseñarse para suprimir la expresión de un gen diana o de múltiples genes diana *en trans*. En este ejemplo, un constructo de ADN recombinante basado en este locus se diseñó para transcribir un solo transcrito que incluye una estructura replegada imperfecta para suprimir múltiples genes endógenos en el maíz: (1) el ARN mensajero que codifica el *LKR* región del gen de la lisina cetoglutarato reductasa / saccharopina deshidrogenasa, *LKRISDH*, y (2) el ARN mensajero que codifica el dominante *De cera* gen, que codifica una enzima para la síntesis de almidón; un fenotipo mutante "ceroso" (sin almidón) caracterizado por amilosa disminuida y amilopectina incrementada (almidón ramificado) se ve típicamente en plantas homocigotas para el alelo recesivo natural (*wx / wx*) y es útil como marcador visual de herencia en crianza de maíz.

La secuencia de ADN recombinante se diseñó en base a una secuencia de inicio de 939 nucleótidos (**SEQ ID NO. 17**), que incluía, en orden: (1) una secuencia líder 5' (**SEQ ID NO. 18**); (2) el brazo 5' de la estructura replegada, que incluye una primera serie de segmentos de ARN contiguos, i. e., siete 21-contiguos (**SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21, SEC ID N°: 22, y SEQ ID NO. 7**) en el orden indicado (5' a 3'); (3) secuencia espaciadora (**SEQ ID NO. 23**) formar un bucle que une los brazos 5' y 3' de la estructura replegada; (4) el brazo 3' de la estructura replegada, que incluye una segunda serie de segmentos de ARN contiguos, i. e., siete 21-contiguos (**SEQ ID NO. 24, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 25, y SEQ ID NO. 26**) en el orden indicado (5' a 3'); y (5) una región 3' no traducida y terminador (**SEQ ID NO. 27**)

Esta secuencia de inicio (**SEQ ID NO. 17**) es útil como un molde de ARN pequeño en fase en la que se basa una construcción de supresión génica; uno o más de los 21-contiguos (o los segmentos de ARN contiguos en la transcripción de ARN correspondiente) que forman la estructura replegada pueden modificarse o modificarse para silenciar un gen diana, como se describió anteriormente bajo el título "Un transcrito de constructo de ADN recombinante" a una primera y una segunda serie de segmentos contiguos de ARN que forman ARN hibridado que se escinde en fase *en vivo*". En esta realización no limitante, los 21-meros diseñados para silenciar uno o más genes diana se seleccionan preferentemente de **SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, y SEQ ID NO. 7**. Preferentemente, una secuencia espaciadora (tal como **SEQ ID NO. 23**) formando un bucle que une los brazos 5' y 3' de la estructura replegada se mantiene en la construcción de supresión génica modificada genéticamente.

En un ejemplo específico, se seleccionaron secuencias de 21 mer seleccionadas (ARN pequeños en fase sintética) para apuntar a *LKR* (**SEQ ID NO. 28, y SEQ ID NO. 29**) o *ceroso* (**SEQ ID NO. 30, y SEQ ID NO. 31**), respectivamente. Estos se clonan en posiciones de fase expresadas de la secuencia molde para producir la construcción de supresión génica que tiene la secuencia

```

aatcttattctacataatttctatcttatatagaacaactagcatagctctcggtgccagccaggttgcccagccaggttgccctggtgcacaatga
gagctggctagggcggactcattctgctgttggtgcccacgatgctagctgctactactagtgaggcctgccatggttctgagaattttt
ggatactccgctgcgtagatatgcactaaaagcttgatgtttcgtgactacatactatggatcacctgttgacaagagaaggattacata
cccgatgaagatgaattggaacatgATGCAAGTGATGTAGCGCCCATATAGGAGTCACTCAGGA
AAGCGCaGCTCGCCAccGAGATGcGCCaAAGATGCAGGTGcATGCTGAcgctaTTGGcGG
CCtCGCATAGATCcCTTGATaTCACTTTGTgGATGCAGAAAGCGGTGcccacggcgagccaa
aaaatgcaaagttggccaacacatagctcactgcatgcaagtagagctgcttaactactgaggtatatacatttagttcgccttctcagcg
ttgccatggacaCCGCTcTCTGCATCaACAAAGTGAcATCAAGtGATCTATGCGtGGCCaCCA
AcaacaTCAGCATaCACCTGCATCTTtGGCaCATCTCctTGGCGAGCgGCGCttTCCGTA
GTGATTCCCTATACGGGGTGCTACTTCACTTGGATCAgtttacaatttatcttcacgtgatatatgctccttctg
ttctcacataggtgatatttaaatgtatgaggcatatatactttctacctaattataaagtatatgcctctatagatcaataaagcagaaa
agtcattgttattaccaatcgtgacttttgtctaaacatctcaactagtttaaagtattgtctctcttga (SEQ ID NO. 32);

```

los brazos 5' y 3' de la estructura replegada están indicados por texto subrayado, los 21-mers diseñados se muestran en negrita, y los nucleótidos desiguales intencionalmente se indican con letra minúscula. Se modificó también la secuencia adicional en cada brazo replegada para preservar la estructura secundaria original (incluida la ubicación de las bases desajustadas) de la secuencia de molde (**SEQ ID NO. 17**). **Figura 5** representa la estructura secundaria predicha del ARN transcrito, respectivamente, a partir de la secuencia de molde (**SEQ ID NO. 17**) y a partir de la construcción de supresión génica generada (**SEQ ID NO. 32**). La expresión de la construcción de

supresión génica modificada está dirigida por un promotor específico de endosperma apropiado, tal como una zeína de maíz o un promotor B32 (nucleótidos 848 a 1259 del número de acceso de GenBank X70153, véase también Hartings et al. (1990) Plant Mol. Biol., 14: 1031-1040) Se diseñan construcciones de ARN pequeños en fase sintética adicionales de una manera similar para silenciar genes diana múltiples, tales como combinaciones de genes endógenos (por ejemplo, LKR / SDH, GLABRA1, DWARF4 y CLAVATA) o transgenes (por ejemplo, genes informadores tales como GUS o GFP), o marcadores seleccionables tales como un gen que imparte tolerancia a antibióticos o herbicidas).

Ejemplo 4

Este ejemplo describe un transcrito de ARN que se pliega en ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños para la supresión génica, en donde el ARN hibridado se produce independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN. Más específicamente, este ejemplo proporciona secuencias de ácidos nucleicos, obtenidas de plantas de monocotiledóneas, que son útiles para hacer una construcción de ADN recombinante que codifica un transcrito que se pliega en ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños para la supresión génica, independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN.

Siguiendo los procedimientos descritos en detalle en el Ejemplo 1, se identificó un segundo locus de "ARN pequeño en fase" a partir del arroz (*Oryza sativa*) bibliotecas maduras de ARN de grano y plántula. Este locus, LOC_Os12g42380.1 | 11982.m08017, tenía la secuencia de ADN

GATTCTCCCCTGCGCCGCCGCCGCCGCCGCCCTCAATCGGGCGAAGCCGCCCTCGCCGCC
 20 GTCGCGGCGGCGGCGGCGAGGGCGAGCTCCTGCGAGAGATCCTCCGCCGCTCATGCCTCG
 CGCGCGCGCTCCCCTCCCCTCTCGCTGCAGTATTTGTTCCATTGCCGCGCACCCTTTCC
 GGTGGGCGGCGGGCAATGCTAGGGGTTAAGAGACCTTCTCTCCCCGAGATGGAGGCGCCGG
 GCGGCGGCGGGGGACGCGGAGGAGGAAGTTGATGCCCGGATCCGCTGGGTTCCATGGTG
 GCTGCTATGGAATGGTGAATTGCTTGGATGGCCACGAAGGGGATCGACGCCAATTGTTTGG
 25 CGACCTCTACGATAGAATCGCGTCGAGTCGGGGTGTTCCTTCTGTTACTAGAAAGTAGTT
 GAATTTCTGATTGAACACACAAGGAAGCTTGATATCGCGTCGGGGTGTTCCTTCTGTTA
 TTAGTAGATGATGTTGGGTTTCGTGATTGAACACCTAAGGAAAGGAAGCTTGATAAATGGATA
 GATAGTCCAGCAAGTTTTGAAGATGATAGAAAATTTGAGCGCGTCGTAGTAACTGTCGTCCA
 CGATCACGTCCAGTGTGTTTCATGGCATGGGGGATGGAGTCAGGATCCTTGAGGCGTCTGCT
 30 CCTGTTGCACTGCTTCATGCCTTTCTGCCTTCTAGGATGCTTAAGATGGTTGCGAAGTCAGG
 TGCTTGGGAGTTCATGAAGCGGTCATAATCAATTTGCTCTCTGTAGTACTTTCTCTGGTGTCT
 TTCCCCGTTGCTTCTTTTGAAGAAAAGCGTCTTTAGAAATCTCTTGAGAGAGTGCACCTTCT
 TCCCTCTCTGCCATCAGTAGTGCCTTTATTTTCGCTTGGTTTCCGCATCATCAGGTGGCACTT
 ATAGAAATTTTTATGGAGGAAAAAGCATTGTATGGCATGATAGAAAATCCTTATGGATA
 35 AAAGTAGGACACTTGCAAGTGTTCATGGGAGTCACCTTACCTTTTTTGCCTACCTGTCTGCA
 TTTTCATGAATGGGATTCCTTCTCTGCGCCGGTGTCTTCTCAAATGGGAAATGGAGGCA
 AGCATCTGCCCTGTTCCATGGTGGCAGCCATGGAATGATGGGATTTCTTTGATGGTCATAAA
 GGAGATCAAACCAACGGTTGGCAATCTCTGCAGGGATGATGAACCAGGCTTGTAATATCT
 GTTGCTGATTTCTTTGGAAGACATAACGGCAAGCTTCATGGGGCACGATGGATTTTCAGATGG
 40 TTGCTTCAGCCATGTCTCAAGATTAGTTGATGGACCTCAAGTTTCTGGGTGCAGTGCCACG
 AGTCTTGGTCAGCCCAAGGTAAGCGCAGGACTGGTGACAAGGCAAGAGGGGAGAAAG
 GCACTCAAAGTTAAGATTAACCTTGCCAGCCCGCCAAAAAATTAAGAAAAGTAGCAAAA
 AGAAGGGCAAAAAGGGCACTGTTGCTGGCAGGATAGGGAGAAAATGCACTCTCTCAAGAGA
 TTCTAAAGGGCGCTTTCTTCCAAGAGAGAGTAAGGGGGGAGACATCGGAGGAAATGCTACA
 45 GAGAGTGAAGTTGATTATGACCGCTTCATGAACCTTTCAGGCACCTGACTTCGCTACCATCTT
 AAGTATTTTGAAGGCTGGAAAGGCATGAAGCAATGTAACAAGATCAGGCGCCTCAAGGAT
 CCTGACTTCGTCCTCTCATGAACGTATGAGCAACACTGGATATGTGACCGAGGATGATGG
 TCACTATGATGTGCTGAAAGTCTTGTATGCATGCAGATGGCTGGTCTGCATAGTGATTCAAGC
 TCTCAAATCAAACATTCAAGCCTATGGCCTTGTGCTAGAACAGTGGTTTCTTCTTTACCT
 50 TTAACCTTGTATGGACTTTGTTCCATTTATCTTAGAAAATTTTGTGCCCCTTGAGTCCGGTGG
 TATGTACTGGAGTATGCTATACTGGGTGATTTAATGGTGATAATGTTAAATCTTGATACTAGT
 TCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO. 33), y un puntaje de unicidad de fase de 0,959, altamente favorable al transcrito de ARN predicho que tiene la secuencia
 55 AGUCCAGCAAGUUUUGAAGAUAGUAGAAAUUUGAGCGCGUCGUAGUAAUCUGUCGUCCA
 CGAUCACGUCCAGUUGUUCUAGGCAUUGGGGAUUGGAGUCAGGAUCCUUGAGGCGUCU
 GCUCUUGUUCACUUGCUUCAUGCCUUCUAGGAUUGCUUAAAGAUUGUUUGCGAA
 GUCAGGUGCUUUGGAGUUCUAGAAGCGGUCUAAUUCUUCGUCUCUUGUAGUACUUU
 CUCUGGUGUCUUCUCCGUUCUUCUUUUUGAAGAAAAGCGUCCUUUAGAAUCUCUUGAG
 AGAGUGCACUUUCUCCUCUCCUGCCAUCAGUAGUGCCUUUUAUUUUCGUUGGUUUCCGG
 60 CAAAAAGGGCACUGUUGCUUGGAGGAUAGGGAGAAAUGCACUCUCUCAAGAGAUUCUA
 AAGGGCGCUUUCUCCAAGAGAGAGUAAGGGGGGAGACAUCGGAGGAAAUGCUACAGAG
 AGUGAAGUUGAUUAUGACCGCUUCAUGAACUUUCAGGCACCUAGCUUCGUACCAUCUUA
 AGUAAUUUGAAAGGCUUGAAAGGCAUGAAGCAAUGUAAACAGAUACAGGCGCCUCAAGGAU

CCUGACUUCGUCCUCUCAUGAACGUCAUGAGCAACACUGGAUAUGUGACCGAGGAUGAU

GGUCACUAUGAUGUGCUGAAA (**SEQ ID NO. 34**) y que contiene la secuencia y la estructura replegada única como se muestra en la figura 6. **Figura 7A** representa la abundancia de ARNip en transcripciones por un cuarto de millón de secuencias ("tpq") a lo largo de toda la secuencia (alrededor de 2 kilobases) y la figura **7B** representa una vista ampliada de la región de ARNip y la fase de 21 nucleótidos de la pequeña abundancia de ARN de este locus.

Al igual que con el locus de ARN pequeño en fases descrito en el Ejemplo 1, el locus teniendo **SEQ ID NO. 33** fue predicho para transcribir a ARN (**SEQ ID NO. 34**) formando ARN hibridado independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN y ser escindible *in vivo* en fase en múltiples ARN pequeños de doble cadena. A diferencia de los ARNip de acción trans, todos los múltiples ARN bicatenarios pequeños derivan del transcrito de ARN original o más del precursor, independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN y sin un sitio objetivo de miARN que inicia la producción de ARN de doble cadena.. A diferencia de los microARN, el locus está escindido *in vivo* a múltiples ARN pequeños en fase abundante, y (como se describe a continuación en el Ejemplo 5), este procedimiento requiere DCL4 o un ortólogo DCL4 y no DCL1.

Datos sobre los ARN pequeños en fase de este locus (**SEQ ID NO. 33**) se proporcionan en **Tabla 4**. La mayoría de estos ARN pequeños en fase se clonaron a partir de las bibliotecas de ARN de arroz pequeño, y varios también se identificaron en el maíz (*Zea mays*) Librerías de ARN preparadas a partir de granos (32 días después de la polinización y 39 días después de la polinización) y raíz (etapa V9), lo que indica que existe un locus de ARN pequeño en fase similar en el maíz. La transcripción (**SEQ ID NO. 34**) predicho a partir de este locus (**SEQ ID NO. 33**) también incluye la secuencia de flaqueo 5' AGUCCAGCAAGUUUGAAGAUGAUAGAAAAUUUGAGCGCGUCGUAGUAACUGUC GUCCACGA (**SEQ ID NO. 66**) y 3' secuencia flanqueante GAGGAUGAUGGUCACUAUGAUGUGCUGAAA (**SEQ ID NO. 67**) así como una secuencia de espaciador UUUUUUUCGCUUGGUUCCGGCAAAAAGGG (**SEQ ID NO. 68**) localizado entre los brazos 5' y 3' de la estructura replegada, que incluye un giro de 3 nucleótidos. **Figura 6** representa la posición relativa de cada pequeño ARN a lo largo de los brazos 5' y 3' de la estructura de ARN hibridado (replegada) (**SEQ ID NO. 34**) pronosticado desde el lugar del arroz (**SEQ ID NO. 33**). La mayoría, pero no todos, de estos ARN pequeños son 21-mers. El pequeño ARN predicho para ser codificado por **SEQ ID NO. 59** contiene 27 nucleótidos, que incluyen un gran bulto de 8 nucleótidos desapareados; se predice que la modificación de esta secuencia para que este pequeño ARN esté más cerca de dos vueltas helicoidales (aproximadamente 21 nucleótidos) da como resultado el procesamiento de este pequeño ARN.

Tabla 4

Ubicación en replegada	Identificador de sARN	SEQ ID NO, (arroz)	SEQ ID NO, (maiz)**	Secuencia	Abundancia (tpq) *				
					grano de arroz	plántula de arroz	grano de maíz 32DAP	Grano de maíz 39DAP	raíz de maíz V9
5' brazo	792014	35		UCACGUCCAGUGUUGUCAUG	2,9	6,0			
5' brazo	***	36		GCAUGGGGAUGGAGUCAGGA					
5' brazo	118041	37	61	UCCUUGAGGCUGUCUCCUG	26,1	56,8	4,2		
5' brazo	657519	38	62	UUGCACUGCUUCAUGCCUUUC	798,5	817,5	23,3	0,9	1,2
5' brazo	611711	39		CUGCCUUCUAGGAUGCUUAAG	2,0	5,0			
5' brazo	1016358	40		AUGGUUGCGAAGUCAGGUGCU	143,1	86,6			
5' brazo	577487	41	63	UGGGAGUUCAUGAAGCGGUCA	216,2	310,7	4,2		
5' brazo	515019	42		UAAUCAUUUCGCUCUCUGUA	9,4	4,0			
5' brazo	803519	43		GUACUUUCUCUGGUGUCUUCC	0,6				
5' brazo	*	44		CCGUUGCUUCCUUUUGGAAGA					
5' brazo	459001	45		AAAGCGUCCUUUAGAAUCUCU	1,4	1,0			
5' brazo	1119948	46	64	UGAGAGAGUGCACUUUCUCCC	194,0	118,5	10,6		
5' brazo	645846	47		UCUCCUGCCAUCAUAGUGGCC	0,8	2,0			
3' brazo	*	48		CACUGUUGCUGGCAGGUAUAGG					
3' brazo	1147125	49		GAGAAAUGCACUCUCUCAAG	0,3				
3' brazo	73294	50		AGAUUCUAAAGGGCGCUUUC		3,0			
3' brazo	1002514	51		UUCCAAAGAGAGUAAGGGGG	0,8	3,0			
3' brazo	1160057	52		GAGACAUCGGAGGAAAUGCUA	0,3	2,0			

(continuación)

Ubicación en replegada	Identificador de sARN	SEQ ID NO, (arroz)	SEQ ID NO, (maíz)**	Secuencia	Abundancia (tpq) *				
					grano de arroz	plántula de arroz	grano de maíz 32DAP	Grano de maíz 39DAP	raíz de maíz V9
3' brazo	1287753	53		CAGAGAGUGAAGUUGAUUJUG	0,3				
3' brazo	1396420	54		ACCGCUUCAUGAACUUCAGG	4,9	13,9			
3' brazo	1125181	55	65	CACCUGACUUCGCUACCAUCU	8,4	5,0	2,1		
3' brazo	628491	56		UAAGUUAUUUGAAAGGCCUGGA	2,3				
3' brazo	985496	57		AAGGCAUGAAGCAAUGJAACA		3,0			
3' brazo	*	58		GAUCAGGGCGCCUCAAGGAUC					
3' brazo	*	59		CUGACUUCGUCCCCUCUCAUGAACGLUCA					
3' brazo	1249464	60		UGAGCAACACUUGGAUJUGUGACC	2,9	1,0			

* "tpq", transcripciones por trimestre de lecturas de secuencia (dadas como promedios de tres ejecuciones de secuencia)
 ** ARN pequeño también clonado a partir de maíz
 *** predicho a partir de la secuencia del locus del sARN en fases (**SEQ ID NO, 33**) pero no clonado

Ejemplo 5

- Este ejemplo describe el ADN que codifica un transcrito que se pliega en ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños ("ARN pequeños en fase") para la supresión génica, en donde el ARN hibridado se produce independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN. El locus de sARN de fase OS06g21900 (descrito en el Ejemplo 1 y con la estructura parcial representada en la figura 1) es procesado *in vivo* a ARN pequeños de múltiples fases; todos los múltiples pequeños ARN bicatenarios se derivan de la cadena positiva del precursor, que los distingue de *trans*-actuando ARNip. Y, a diferencia de los microARN, el locus contiene múltiples ARN pequeños en fases abundantes. Este ejemplo proporciona una caracterización adicional de un locus de ARN pequeño en fase como claramente distinto de los microARN canónicos y *trans*-activos ARNip.
- 10 El locus de sARN en fases Os06g21900, localizado en el cromosoma 6 de arroz, se caracterizó adicionalmente. Un precursor de 898 nucleótidos que se mapeó a este locus se secuenció a partir del clon de biblioteca LIB4833-001-R1-N1-G10 y se encontró que tenía la secuencia de ADN

AATCTTATTCTACATATTTCTATCTTATATAGAACAACACTAGCATAGCTCTCGTTGCCAGCC
 AGGTTGCCAGCCAGGTTGCCTGGTGCACAATGAGAGCTGGCTAGGGCGGACTCATTCTG
 CTGTTGGTGCCCAACGATGCTAGCTGCTACTCATACTAGTGAAGCCTGCCATGGTTCTGAG
 AAATTTTGGATACTCCGCTGCGTAGATATGCACTAAAAGCTTGTATGTTTCGCTGACTAC
 ATACTATGGATATCACCTGTTTGACAAGAGAAGGATTACATACCACGATGAAGATGAATT
 GGAACATGATGCAAGTGATGTAGCGCCCCATATAGGAGTCACTCAGGAAAGCACAGAAGA
 GGGAGAAGATGTAGACGGTGCCCATCCACATGCTGACGCTATTGGCGGCCTCGGCGTTCTC
 CTGGTGGAGCACCTGCCTGAGGAACACCACCAGGCCACGGCGACGCCAAAAAATGCAAA
 GTTGGCCAACACATAGCTCACTGCATCGTCAAGTAGAGCTGCTTAATCACTGAGGTATATA
 CATTTAGTTCGCCTTCTTCAGCGTTGCCATGGACCTGGTGATGTTCTTCCGGCGGGTGCCCC
 ACCAAGAGAACGCCGTGGCCACCAACAACATCAGCATATGGATGGGCACCATCTTCATCT
 TTGCCCTCTTTAGTGCTTTCCGTAGTGATTCTTACGTTCTGTTCTCACATAGGTGATATCTTAAA
 TGTATGAGGCATATATACTTTCTACCTAATATTATAAAGTATATGCCTCTATATAGATCAA
 ATAAAGCAGAAAAGTCATTGTTATTACAAAAA(AAA)AAAAA (SEQ ID NO. 69);

- la transcripción correspondiente contenía los ARN pequeños en fase (ver **Ejemplo 1**) distribuido entre dos regiones a lo largo de la transcripción (**Figura 8A**). Este locus contiene dos exones (exones 2 y 3, indicados por las regiones sombreadas) que forman una estructura larga, imperfecta y plegada que contiene ocho ARN de doble cadena pequeños de 21 nucleótidos, separados por un intrón de ~1.2 kB (**Figura 8B**). No se encontraron ARN pequeños que coincidieran con el Exón 1, ni ninguna secuencia diana de miARN que pudiera iniciar un *trans*-se identifica la fase de ARN i activa (ver Allen et al. (2005) Cell, 121: 207-221; Vaucheret (2005) Sci. STKE, 2005, e43; y Yoshikawa et al. (2005) Genes Dev., 19: 2164-2175) El análisis de transferencia de gel de ARN del ARN pequeño en fase más abundante confirmó que la expresión era específica del grano de arroz (**Figura 8C**). Ninguno de los dos pequeños ARN en fase más abundantes ("P7", **SEQ ID NO. 6**, y "P4", **SEQ ID NO. 3**) fue detectado en plántulas de arroz o en otras especies de plantas probadas.

- Los ARN pequeños en fase forman una nueva clase de ARN pequeños reguladores que difieren de los microARN canónicos (miARN) y *trans*-actuando ARNip. Los ARN pequeños en fase descritos en el presente documento son en cierta medida una reminiscencia de miR163 en *Arabidopsis* en el que se secuenciaron dos fases de ARNip con un solo ARN pequeño (miR163 en sí mismo) acumulándose significativamente; ver Allen et al. (2004) Nat. Genet., 36: 1282-1290; y Kurihara y Watanabe (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 101: 12753-12758. Sin embargo, los ARN pequeños en fase difieren claramente de miR163 en que se procesan múltiples ARN pequeños en fase abundante y pueden aislarse a partir de un solo transcrito. El locus de ARN pequeños en fase es una estructura replegada imperfecta, extendida, única (por ejemplo, los loci representados en la figura 1, la figura 6, o **Figura 8B**), y por lo tanto también es claramente diferente de la *trans*-actuando sici loci identificados en *Arabidopsis*, que requieren una ARN polimerasa dependiente de ARN (RDR6) para generar el ARN bicatenario a partir del cual se procesan los ARNip en fase.

- La estructura replegada extendida del locus de ARN pequeño en fase Os06g21900 sugiere que este precursor no se procesa a través de la vía canónica de miARN. La naturaleza gradual de los ARN en fases pequeñas indica además que son el resultado del procesamiento por DCL4 o un ortólogo DCL4 en lugar de por DCL1. Para confirmar adicionalmente que los ARN pequeños en fase descritos en el presente documento son únicos y distintos de los microARN canónicos (miARN) y *trans*-activo ARNip, la longitud completa de ADNc Os06g21900 phased small locus

ARN se transformó en *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) ecotipo y mutantes *dcl1-7* (un knock-out de DCL1) y *dcl4-1* (un knock-out DCL4). Se extrajo el ARN y se analizaron las transferencias usando sondas correspondientes a ARN pequeños en fase "P7". (SEQ ID NO. 6), y "P5" (SEQ ID NO. 4), un miARN canónico (miR173) y un *trans*-activo ARNip (ta-siR255) (Figura 8D).

5 Los ARN pequeños de 21 nucleótidos en fase se expresaron en gran medida en eventos de transformación de Col-0 y *dcl1-7*, pero en el *dcl4-1* mutante, sARN en fase de 21 nucleótidos estaban ausentes, observándose sólo pequeños ARN débiles de 24 nucleótidos (similar a lo que se observó para ta-siR255). Estos datos son consistentes con la función de DCL4 en el procesamiento de ARN pequeños en fase, pero, a diferencia de *trans*-ARNip que actúan, no se requirió un sitio de iniciación de miARN en el caso de los loci de ARN pequeños en fase descritos en el presente documento. Estos datos también demostraron que el locus de ARN pequeño en fase de una planta de cultivo de monocotiledóneas se procesó de manera eficiente en una planta dicotiledónea. Por lo tanto, los sARN en fase se procesan a través de vías distintas de las de los microARN canónicos (miARN) y *trans*-activos ARNip. Como se describe en otros ejemplos descritos en el presente documento, el locus de ARN pequeño en fase es útil como molde para diseñar una construcción de ADN recombinante que codifica un transcrito que se pliega en ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños para la supresión génica, o alternativamente como un molde para diseñar una construcción de ADN recombinante que incluye ADN que transcribe: (a) una primera serie de segmentos de ARN contiguos, y (b) una segunda serie de segmentos de ARN contiguos, donde la primera serie de segmentos contiguos de ARN hibrida *in vivo* a la segunda serie de segmentos de ARN para formar ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños ("ARN pequeños en fase") para la supresión génica.

Ejemplo 6

Este ejemplo describe una construcción de ADN recombinante que incluye ADN que transcribe a: (a) una primera serie de segmentos de ARN contiguos, y (b) una segunda serie de segmentos de ARN contiguos, en donde la primera serie de segmentos de ARN contiguos hibrida *in vivo* a la segunda serie de segmentos de ARN para formar ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños ("ARN pequeños en fase") para la supresión génica.

Este ejemplo proporciona un aspecto de una construcción de ADN recombinante que incluye secuencias de ácido nucleico derivadas de plantas de cultivo de monocotiledóneas, que transcribe a un ARN que contiene una estructura replegada individual escindible *in vivo* y en fase a múltiples ARN bicatenarios pequeños para la supresión génica, independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN. Este ejemplo es una construcción de ADN recombinante diseñada para suprimir múltiples genes diana. El locus de ARN pequeño en fase Os06g21900 (ver **Ejemplo 1**) se modificó para suprimir tres genes diana de la siguiente manera: nucleótidos de los ARN pequeños en fase con los identificadores 1196700 (SEQ ID NO. 3), 1379342 (SEQ ID NO. 6), y 544819 (SEQ ID NO. 7) fueron reemplazados, respectivamente, con nucleótidos correspondientes a un segmento de los genes GL1, IDA y LFY de *Arabidopsis thaliana*. La secuencia resultante fue

```
GGTACCAATCTTATTCTACATATTTCTATCTTATATAGAACAACACTAGCATAGCTCTCGTTGC
CCAGCCAGGTTGCCAGCCAGGTTGCCTGGTGCACAATGAGAGCTGGCTAGGGCGGACTC
ATTCTGCTGTTGGTGCCCAACGATGCTAGCTGCTACTCATACTAGTGAAGCCTGCCATGGT
TCTGAGAAATTTTTGGATACTCCGCTGCGTAGATATGCACTAAAAGCTTGTATGTTTCGCT
GACTACATACTATGGATATCACCTGTTTGACAAGAGAAGGATTACATAACCACGATGAAGA
TGAATTGGAACATGATGCAAGTGATGTAGCGCCCATATAGGAGTCACTCAGGACTCCAC
GGTCATTGTGTATCATGTAGACGGTGCCCATCCACATGCTGACGCTATTGGCGGCCTTGGT
CCTTCATAGAGACCCAACCTAACAGTGAACGTACTGTGCGCCACGCGACGCCAAAAAA
TGCAAAGTTGGCCAACACATAGCTCACTGCATCGTCAAGTAGAGCTGCTTAATCACTGAGG
TATATACATTTAGTTCGCCTTCTTCAGCGTTGCCATGGAGCGACAGAACGTTACGGTTAG
GTTGTGTCTCTTTGAAGGACCATGGCCACCAACAACATCAGCATATGGATGGGCACCATCT
TCATGATGAACAATGACGGTGGAGTCCGTAGTGATTCTTACGGGGTGCTACTTCACTTG
GATCATGTTACAATTTATCTTCATCGTGATATATGCTCCTTCTGTTCTCACATAGGTGATAT
CTTAAATGTATGAGGCATATATACTTTCTACCTAATATTATAAAGTATATGCCTCTATATA
GATCAAATAAAGCAGAAAAGTCATTGTTATTACGTTAAC (SEQ ID NO. 70).
```

Esta secuencia se sintetizó, se subclonó en un vector binario de dicotiledónea (pMON97890) que incluía un marcador seleccionable de resistencia al glifosato, y se transformó en *Arabidopsis thaliana* usando una técnica de

5 inmersión floral como se describe por Clough y Bent (1998), Plant J., 16: 735-743. Los eventos resultantes se seleccionan usando glifosato, y las plantas seleccionadas se criban para los fenotipos esperados, i. e., pérdida de tricomas por supresión de GL1 (Marks y Feldmann (1989) Plant Cell, 1: 1043-1050), prevención de la abscisión de pétalos mediante supresión de IDA (Butenko et al. (2003) Plant Cell, 15: 2296-2307), y la conversión de flor en hoja por supresión de LFY (Schwab et al. (2006) Plant Cell, 18: 1121-1133).

Ejemplo 7

10 Este ejemplo describe una construcción de ADN recombinante que incluye ADN que transcribe a: (a) una primera serie de segmentos de ARN contiguos, y (b) una segunda serie de segmentos de ARN contiguos, en donde la primera serie de segmentos de ARN contiguos hibrida *in vivo* a la segunda serie de segmentos de ARN para formar ARN hibridado que se escinde en fase *in vivo* en múltiples ARN bicatenarios pequeños ("ARN pequeños en fase") para la supresión génica. Más específicamente, este ejemplo describe una construcción de ADN recombinante que transcribe al ARN escindido *in vivo* en fase en ARN pequeños en fase para la supresión génica de múltiples virus en las plantas.

15 Los ARN pequeños en fase se diseñaron para dirigirse a regiones altamente homólogas de geminivirus, tospovirus y un potexvirus de importancia económica que infectan al tomate. Estos virus incluyen el virus del rizado de la hoja amarilla del tomate (aislado de la República Dominicana), el virus de Nueva Delhi del rizado de la hoja del tomate, el virus del rizado de la hoja del tomate, el virus de la vena amarilla de Pepper huasteco, el mosaico del pimiento dorado, *Pepino* virus del mosaico, virus del marchitamiento manchado del tomate, virus de la necrosis del brote del maní, y *Pimiento* virus de la clorosis. Las regiones homólogas permiten un conjunto limitado de ARN pequeños en fase para controlar muchos virus; adicionalmente, se predice que estas regiones conservadas tienen menos probabilidades de desarrollar resistencia debido a cambios en la base que impedirían o evitarían la supresión por ARN pequeños en fase. La puntuación de Reynolds, la asimetría funcional y las propiedades de los miARN se tuvieron en cuenta al seleccionar las secuencias diana para la supresión. Se utilizan ARN pequeños de fases múltiples para mejorar el silenciamiento y prevenir la resistencia.

25 En este ejemplo, las secuencias de nucleótidos para suprimir múltiples dianas virales se usaron para reemplazar las secuencias nativas (es decir, segmentos de cada uno de los 21 nucleótidos contiguos) de los abundantes ARN pequeños en fase derivados de una secuencia de armazón (el ADNc de Os06g21900, **SEQ ID NO. 69**), con nucleótidos adicionales cambiados cuando sea necesario para preservar la estructura secundaria como se encuentra en la transcripción del precursor nativo. Los segmentos de reemplazo de 21 nucleótidos incluyeron dos
30 secuencias para suprimir geminivirus, TGGTACAACGTCATTGATGAC (**SEQ ID NO. 71**) y TGGACCTTACATGGCCCTTCA (**SEQ ID NO. 72**), una secuencia para suprimir potexvirus, TAATTGTGCAGCTCATCACCC (**SEQ ID NO. 73**), y tres secuencias para suprimir tospovirus (una para cada segmento de estos virus tripartitos), TAGATGGGAAATATAGATATC (**SEQ ID NO. 74**, dirigirse al segmento M de tospovirus), TGCTTATATGTATGTTCTGTA (**SEQ ID NO. 75**, dirigirse al segmento L de tospovirus) y
35 TCAAGAGTCTTTGAAAGAAAG (**SEQ ID NO. 76**, dirigirse al segmento S de tospovirus). Los segmentos de reemplazo se incorporaron a una secuencia de ADN que codifica un precursor de ARN pequeño en fase sintético (es decir, un transcrito de ARN que se escindió). *in vivo* en fase en ARN pequeños en fase para la supresión génica de múltiples virus en plantas),

AATCTTATTCTACATATTTCTATCTTATATAGAACAACACTAGCATAGCTCTCGTTGCC
 CAGCCAGGTTGCCAGCCAGGTTGCCTGGTGCACAATGAGAGCTGGCTAGGGCGG
 ACTCATTCTGCTGTTGGTGCCCAACGATGCTAGCTGCTACTCATACTAGTGAAGCC
 TGCCATGGTTCTGAGAAATTTTTGGATACTCCGCTGCGTAGATATGCACTAAAAGC
 TTGTATGTTTCGCTGACTACATACTATGGATATCACCTGTTTGACAAGAGAAGGAT
 TACATACCACGATGAAGATGAATTGGAACATGTGGACCTTACATGGCCCTTCAA
TATAGGAGTCACTCAGGAgteatCcGtgacGttAtAccAgacAtcCatatCccatcCActtTctCtt
agagacCcttgTgGGtGaTgagtTGcacaGttaCCTGCTTATATGTATGTTCTGTACCCACG
 GCGACGCCAAAAAATGCAAAGTTGGCCAACACATAGCTCACTGCATCGTCAAGTA
 GAGCTGCTTAATCACTGAGGTATATACATTTAGTTCGCCTTCTTCAGCGTTGCCATG
GAtacaGaaAatacaTatCaGCGGGTAATTGTGCAGCTCATCACCTCAAGAGTCTTT
GAAAGAAAGTAGATGGGAAATATAGATATCTGGTACAACGTCATTGATGACT
CCGTAGTGATTCCCTATACTGaagGgccacgtAaggtGcaCATGTTACAATTTATCTTCATC
 GTGATATATGCTCCTTCTGTTCTCACATAGGTGATATCTTAAAATGTATGAGGCAT
 ATATACTTTCTACCTAATATTATAAAGTATATGCCTCTATATAGATCAAATAAAGC
 AGAAAAGTCATTGTTATTAC (SEQ ID NO. 77),

donde el texto subrayado indica la ubicación de los segmentos de 21 nucleótidos de reemplazo (ARN pequeños en fases) para suprimir virus, el texto en negrita indica nucleótidos en la estructura replegada y la fuente en minúsculas indica que los nucleótidos cambiaron para preservar la estructura secundaria como se encontró en la transcrito precursor nativa. **Figura 9A** representa la estructura replegada de la transcripción del locus endógeno de ARN pequeño en fase Os06g21900 (SEQ ID NO. 69); **Figura 9B** representa la estructura replegada del precursor de ARN pequeño en fase sintético codificado por **SEQ ID NO. 77**.

Ejemplo 8

Este ejemplo describe la identificación de los objetivos de un ARN que se escinde *in vivo* en fase en ARN pequeños en fase para la supresión de genes. Más específicamente, este ejemplo describe la identificación de dianas de ARN pequeños en fase producidos a partir de un locus de ARN pequeño en fase nativo.

Putativos genes diana regulados por los ARN pequeños en fase (ver **Tabla 4**) producido a partir del locus **SEQ ID NO. 33** fueron pronosticados a partir de las bases de datos de ADNc de la planta usando el algoritmo miRSite. miRSite predice objetivos de miARN por comparación de similitud de secuencia entre el miARN de entrada y el conjunto de datos de ADNc diana. Los pares miARN: diana (o análogamente, los pequeños pares de ARN: objetivo) se puntuaron según las reglas establecidas a partir de objetivos de miARN validados experimentalmente (Allen et al. (2005) Cell, 121: 207-221) Brevemente, los pares erróneos y las brechas de nucleótido único se puntuaron como 1, los pares G: U como 0,5, los puntajes para los pares erróneos de las bases 2 a 13 se duplicaron, y se sumaron a lo largo de la longitud del objetivo. Los objetivos previstos se clasificaron de acuerdo con sus puntajes de penalización, con puntajes menores de 4,5 considerados como objetivos putativos. En el caso de miARN conservados o ARN pequeño en fase, se dieron preferencia a los objetivos presentes en genes y ubicaciones ortólogas. **Tabla 5** proporciona ejemplos no limitantes de genes diana (y el sitio de reconocimiento identificado en el transcrito de ARN del gen diana) que se predice que será regulado por ARN regulados en fases pequeños del locus que tiene **SEQ ID NO. 33**; la alineación del ARN pequeño en fase y el sitio de reconocimiento también se representa.

SEQ ID NO. del ARN pequeño en fase	SEQ ID NO. del Sitio de reconocimiento	objetivo predicho			alineación (ARN pequeño en fase representada de 3' a 5' arriba, sitio de reconocimiento representado de 5' a 3' abajo)	Puntuación	Apareamiento erróneo
		objetivo SEQ ID NO	Locus del transcrito de referencia	anotación			
40	92	93	MRT4577_124267C.1,	Transportador ABC ATPasa	3' ACUGGCGAAGUACUUGAGGGU 5' : : : : : : : : : : : : : : : : aggccuuuuucaugaacuccca	3	4
39	94	95	MRT4530_10744C.5, Os11g30910	Proteína del dominio de la sulfotransferasa	3' UCGUGGACUGAAGCGUUGGUA 5' : : : : : : : : : : : : : : gggcucgcuccuucgcaaccgau	4,5	5
39	96	97	MRT4530_105985C.3, Os06g13720	Subunidad alfa de piruvato deshidrogenasa	3' UCGUGGACUGAAGCGUUGGUA 5' : : : : : : : : : : : : : : : ggcccaugacuugcaaccac	4,5	5

- 5 La técnica conocida como amplificación rápida mediada por ARN ligasa de los extremos 5 'de ADNc ("5' RLM-RACE") se usa para validar experimentalmente los objetivos predichos en las plantas (por ejemplo, arroz y maíz); véase, por ejemplo, Kasschau et al. (2003) Dev. Cell, 4: 205-216 y Llave et al. (2002) Science, 297: 2053-2056. Este enfoque se basa en la unión de una molécula adaptadora de ARN al extremo 5 'del sitio de escisión y depende del fosfato 5' que dejan las enzimas ARNasa III, incluida Ago1. Los productos de PCR resultantes se secuencian y el número relativo de clones que se alinean con el sitio de escisión del miARN (o ARN pequeño en fase) entre los nucleótidos 10 y 11 en relación con miARN (o ARN pequeño en fase) proporcionan una estimación de miARN (o ARN pequeño en fase) actividad. Los resultados de 5 'RLM-RACE ensayos se utilizan para confirmar la división de un objetivo previsto por cualquiera de los pequeños ARN en fase.
- 10 La identificación y validación de genes endógenos regulados por ARN pequeños en fase a partir de un locus de ARN pequeño en fase expresado de forma nativa es útil, por ejemplo, para eliminar o modificar un sitio de reconocimiento de ARN pequeño en fase en un gen endógeno para desacoplar la expresión de ese gen de la regulación por el ARN pequeño en fase que regula de forma nativa la expresión del gen. Por ejemplo, puede aumentarse el número de pares erróneos que implican bases en las posiciones 2 a 13 (en un sitio de reconocimiento de ARN pequeño en fase que tiene 21 nucleótidos contiguos) para evitar el reconocimiento y la escisión por el ARN pequeño en fase.
- 15

Todos los materiales y procedimientos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden prepararse y usarse sin excesiva experimentación como se indica en la descripción anterior.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Allen, Edwards
Guo, Liang
Heisel, Sara E.
Ivashuta, Sergey I.
Zhang, Yuanji I.
- 25 <120> ARN pequeño en fase
- <130> 38-21(54702)B
- 30 <150> 60/841.608
<151> 31-08-2006
- <160> 97
- 35 <210> 1
<211> 21
<212> ARN
<213> *Oryza sativa*
- 40 <400> 1
augcaaguga uguagcgccc c 21
- 45 <210> 2
<211> 21
<212> ARN
<213> *Oryza sativa*
- 50 <400> 2
auauaggagu cacucaggaa a 21
- 55 <210> 3
<211> 21
<212> ARN
<213> *Oryza sativa*
- 60 <400> 3
ucuuugcccu cuuuagugcu u 21
- <210> 4
<211> 21
<212> ARN
<213> *Oryza sativa*

ES 2 655 700 T3

<400> 4
 uauggauggg caccaucuuc a 21

 5 <210> 5
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

 10 <400> 5
 uggccaccaa caacaucagc a 21

 15 <210> 6
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

 20 <400> 6
 ugccccacca agagaacgcc g 21

 25 <210> 7
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

 30 <400> 7
 ugccugagga acaccacca g 21

 <210> 8
 <211> 5521
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

 <400> 8

 aaaatctcta ccatctcact tttgtaataa taccataaat gctttgccat atgtaaaacc 60
 gttcgagtag cgacaacacc ggttctataa aagttgttcc ctttccacgt acttataagc 120
 ttatctagtg tgcacgcatt ccctttccac gtattttccac gtattttccat taaccttate 180
 ttgtgtgcac gcataaggta catgggtaat aacatgttct tgggaagtggc ccttacctac 240
 accgctatat aaagcgacgc ctctcattgc gacaccacca atcttattct acatatttct 300
 atcttatata gaacaactag catagctctc gttgcccagc caggttgccc agccagggtg 360
 cctggtgcac aatgagagct ggctagggcg gactcattct gctgttgggtg cccaacgatg 420
 ctagctgcta ctcatactag tgaagcctgc catggttctg agaaatcttt ggatactccg 480
 ctgcgtagat atgcactaaa agcttgtatg tttcgtgac tacatactat ggtgagatcc 540
 taaagtatta cctatttatt taccttttta tagtttctat atattacttc agatgacgag 600
 atcatttagc acgcataaac aagtcacaaa ttattaagta aaattctttc aagtttttgc 660
 agaccttggt gtatctttct cactttttat gtctttttta acctcaaaag tcacatgtac 720
 attcaactgc attcatgtcc aaatctttct agaatgattg cttggtcttt gtttcgttac 780
 tacgggtgatt tttcagcatg catataagtt cctcttcggt cttcgtttct cctttcaagg 840
 attgatctat ctaggggaga taggaatcaa gcaaattggt caccgtccca tgcactatat 900
 gctagatccc attgtttttt ctttttaaat aatgccattt caccaggtac cattgcttta 960

35

ES 2 655 700 T3

gaaaaaaaaat ggtcagtaac gagatthtaa tatctagcct gtcttttata agatatacca 1020
 ggtgtcttct ataagatata ccaggtaa atagtagcat agaattttct aacggttcaa 1080
 ccagggacaa tttgttttca cctagctgcg tacacaccca ttttatccac gcgcttctta 1140
 aatagggtta aaaatataaa acaaattggt agcatagatt ttcttttaag agacgtaaaa 1200
 tatattatga tgacaaatac ctcttgcca accaggctca aattattact ctaaactggt 1260
 ttacaccaa acttcagcct aaacagaaac atgcctggtt atacatgcc aagagattgct 1320
 tgttcgggtt ggagaggatt gagggattcc gcaccactaa aggtgtgtaa taaatccct 1380
 ccaatctcac ttcttgagga tcaatcgaac atcacattaa aagaaaaaac atgtttggtg 1440
 cacgttctta aataaaggcg gagtacaac gtctgtcga cagcaccaat gcaacaact 1500
 gaatttaaca gccatttcat gataattata tatatatata tatatatata aaagatgtat 1560
 ctagctagac tatatatatg tggctatcct gtggactgga gctgatcccc tccacctccg 1620
 gctcgatgcc cttgaacaac cgcgcaaca cgatgaacac gacgaggtcc acggcggaca 1680
 gcacggcgag ggtgatgaag gagcggtcga ggtggccgcg gtcgagctcg gccaggatcc 1740
 accccgcct cctccgcgc gtcgcgcgc gcgaggcgac gccgctgat gcgctcaca 1800
 tcaccatgct ggcgtagttc cccagcgaga tggacgccat gcacagcgag ctccccaggc 1860
 tcttcccc ctccggcgac tgcacgttga agaactccag ctgccccacg tacacgaaca 1920
 cctccgacgc gccatcacc gcgtactgcg gcgcctgcca cagcacgctc atggcgcggc 1980
 cgccggcgcc ggatcgcgcg cgccgggtgga cctcgacgac cgccggcgcg accatgccga 2040
 gcagcgcgat cacgaggccc gcgccatgc gcttgagctc gccgacgccc cgccgggtct 2100
 tggtcagcct cgccgccgcg ggcaccagga cgtagtggga gaaggcgagc gtggcgagca 2160
 cgccggcgac gtcgaacacc gacatggacg cgccggcgcg gttgaacagg cccaggatgt 2220
 cgggtgcat ggccgcgct tgcctcacga acaaggacga catctgggtg aactccacgg 2280
 agtagacgat gctgcagatc cagatgggca ccatgctcac cagcacttg gcctctcca 2340
 cctgcgtcac cgtgcacagt ctccacgggt tcttggcggt cccgtcgtgg tagtctct 2400
 cggtcgcct cgccgcttg tcaagaaacc tgagctggtc gctgtgggag agcttgccga 2460
 cgccacggat cgccgagccc tcgccatcga cctcgtggag gtggtcgccg ggcggcgcca 2520
 cgatgtgccg cttgcggtac gggcgacga acacctgggc gatgcggtg agcgggttg 2580
 cggcaggtcg gaccggcgcg tagcgcgcg tgcggaggag aaagagcgcg agcgcgagcg 2640
 cggcgggcggc ggtggagacc cagaagccgg cgaccacccg gccctgtcc tcgaagaaca 2700
 ccaggacgga gttgtagaag agggagccga cgttgagcga gaggtagaag aggcagaaga 2760
 aggcctgctt gcgcccgc tcgcccgggt cggcgtcgtc gaactggtcg gcgcccgaacg 2820
 tcgccaccga eggctgttac ccgcccgtcc cgaacgccgc catgtagatg gacaggtaga 2880
 acaccgcgac gccacgcgg gagcgcgccg cgcactgct gagcccgccg ccgtcgcgc 2940
 accccggcg ctcaccagc aagaaccacg acaacagcga caggagcatc aaccctgca 3000
 tgccaaaaca cacaagaaat taaactgtc tcatgcatca actgctgaca ctcttaacct 3060

ES 2 655 700 T3

tataataact ttaaacttat aattcagttt tgctatthtc agtcgctctga aatcaaaatt 3120
gcacatatgc tctgtthttt acataattaa gattgtthta aatgttgaca cagtatthtat 3180
gttgthtatat thttatactac tgctgagtht atcctgatat ctgactgcat atthttcagg 3240
atatcacctg thtgacaaga gaaggattac ataccacgat gaagatgaat tggaacatga 3300
tgcaagtgat gtagcgcctc atataggagt cactcaggaa agcacagaag agggagaaga 3360
ttagtagcgt gcccatccac atgctgacgc tattggcggc ctgcggcttc tctggtgga 3420
gcacctgcct gaggaacacc accaggccca cggcgacgcc aaaaaatgca aagtthgcca 3480
acacatagct cactgcatcg tcaagtagag ctgcttaatc actgaggtaa aataaatatt 3540
thaatthctt thggatcaaa ccactatata tgccccatt thgcatthga gtgthgttca 3600
acactgthta gthttatctt actatatac thaaaagcac agtcatctt atthccatc 3660
tatccataag aaacactaga aaaaactaac caathgagag aaaaatagg gagaagagaa 3720
aaaaaatta aaccacatc accatatac atcctthtc aaggcacggt cctatgacta 3780
gtatthgata aathgataga thgtthctca cattatath gtataaatc thgactatta 3840
gthaatcaaa cactatthac cacgaaaaa aagagagat thggatgaga thgtggggat 3900
thaatthttt ccaagaagta gtgctattht catctthctt ctthgagtht thgthctgg 3960
gctthcctgg aathgtthgg thtthcttc agththgaca aathgactc thgthtatc 4020
ggaathgcat ggagagcatg atccccaga thcaacatc thcathggct ththaaaaa 4080
agthgthgag gaaaaaggth tcacaactca cthaccactc thctagaaag thataaggat 4140
agactaaaa ththtagath ththattctg thththgath thctgctgaca aataaathg 4200
acaaacagaa caathgath tgaagthta cctatcatat thcaathata ththcaacgt 4260
aacaagthg aaththaaag acatcatctt ggggagtht thaththgta cthctctcat 4320
thcaaatgt thgacgctg thgactthtt aathatgtht gacgththt cthattcaaa 4380
aaththathg aaththaat thththctta thctthgath ththththaa thactthtt 4440
thgthtatata thgththata thththcata aagthththg athagacgaa cggthcaaca 4500
thththaaaa agccaacggc thcaaacatt thaggaagga gggagthata ththaaaaa 4560
athatgathg ththagthth thctctctct thgagagtht ththctctct thcaththtt 4620
gaaathcctc gccataccg agaththcaaa thaththgath aaththcaaa atcatathtt 4680
thaatgthth ththththatt ththaaactt gctagthata thcaththgth thctctctt 4740
cagcgtthgc atggacctg thgaththctt cggcgggth cccaccaag agaacgctg 4800
ggccaacaa aacatcagca ththgathgg caccatctt atctthgccc thththgthc 4860
ththcctgath gathctata cgggthgth cthcactthg athcatgtht aaththctt 4920
cathctgata thgthctct ctgthctcac athgthgata thththaaath thgagthcat 4980
athacttht thcctaatat ththaaathg athctctat athagathca athaaagcaga 5040
aagthcathg thththcaaa thgthgactt thgtththaa catctcaact agththaaath 5100

ES 2 655 700 T3

atttgtctct cttgagcaat gggtttaaac ctctccacgg atgggagaga acctotacta 5160
 tttgattggt ccaacttttg acacaataga aacacagatg atactgaagg tatgaaaggt 5220
 aatatagttag ttaaggttcc aatcattcaa atgctggaaa gtacatttac ttctatttta 5280
 aactattaag gggtaaaaaa aaacagatat acgctcttac tctgatctca aatgccatga 5340
 tctctgcaga tcccacggtg tcgggaacct tcaatacгаа tatatatata aaaaagaaaa 5400
 gatcagtaag gaaatgtttg atctgctagc cttagttttc atattattaa attttagaaa 5460
 atacaagtaa gattataaaa ttataagttt gctacaatat ttatgtctga acatagtata 5520
 a 5521

5 <210> 9
 <211> 2454
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2454)
 <223> N es A, T, G o C

15 <220>
 <221> incierto
 <222> (1)..(2454)
 <223> incierto en todas las n localizaciones

<400> 9

aatcttattc tacatatattc tatcttatat agaacaacta gcatagctct cgttgcccag 60
 ccaggttgcc cagccagggt gcctgggtgca caatgagagc tggctagggc ggactcattc 120
 tgctgttggt gcccaacgat gctagctgct actcatacta gtgaagcctg ccatggttct 180
 gagaaatttt tggatactcc gctgcgtaga tatgcactaa aagcttgtat gtttcgctga 240
 ctacatacta tgctagacta tatatatgtg gtcacacctg ggactggagc tgatccccctc 300
 cacctccggc tcgatgccct tgaacaaccg cgcgaaacag atgaaacaga cgagggtccac 360
 ggcggacagc acggcgaggg tgatgaagga gcggtcgagg tggccgaggc cgagctcggc 420
 caggatccac cccgccgtcc ctccgccggt ccgccgccgc gaggcgagc cgctgatggc 480
 gctcaccatc accatgctgg cgtagttccc cagcgagatg gacgccatgc acagcgagct 540
 ccccaggctc ttcaccccct ccggcgactg cacggtgaag aactccagct gccccacgta 600
 cacgaacacc tccgacgcgc ccatcaccgc gtactgcggc gcctgccaca gcacgctcat 660
 ggcgcggccg ccggcgccgg atcggcgggc gcggtggacc tcgacgaccg ccgcgggcgac 720
 catgccgagc agcgcgatca cgaggccccg gcccatgcgc ttgagctcgc cgacgccgcg 780
 cgggttcttg gtcagcctcg ccgcccggg caccaggacg tagtgggaga aggcgagcgt 840
 ggcgagcacg ccggcgacgt cgaacaccga catggacgcg gccggcgcgt tgaacaggcc 900
 caggatgtcg gtgtccatgg ccgcgccttg ctccacgaac aaggacgaca tctgggtgaa 960
 ctccacggag tagacgatgc tgcagatcca gatgggcacc atgctcacca cgcacttggc 1020
 ctccctccacc tgcgtcaccg tgcacagtct ccaagggttc ttggcggttc cgtcgtggta 1080

20

ES 2 655 700 T3

gtcctcctcg gtcgcccgtcg ccgccttgtc aagaaacctg agctggtcgc tgtgggcgag 1140
 cttgccgacg ccacggatcg ccgagccctc gccatcgacc tcgtggaggt ggtegcceggg 1200
 cggcggcaag atgtgcccgt ggggttagtc ngggacgaac acctgggcga tgcgggtgag 1260
 cgggttgccg gcaggtcggg cccggcggta ggcggcgtg ccgaggagaa agagcgcgag 1320
 cgcgagcgcg gcggcggcgg tggagacca gaagccggcg acccaccggc cctgtcctc 1380
 gaagaacacc aggacggagt tgtagaagag ggagccgacg ttgagcgaga ggtagaagag 1440
 gcagaagaag gcctgcttgc gccgcctc gccggggtcg gcgtcgtcga actggtcggc 1500
 gccgaacgtc gccaccgacg gctggtacc gccgttcccg aacgcgcga tgtagatgga 1560
 caggtagaac accgcgacgc cagccggga cggcgcgcg cactgcctga gccgcgcgc 1620
 gtcgccgcac cccggcggct ccaccacca caaccacgac aacagcgaca ggagcatcaa 1680
 ccccacgatg aagatgaatt ggaacatgat gcaagtgat tagcgcacca tataggagt 1740
 actcaggaaa gcacagaaga gggagaagat gtagacggtg cccatccaca tgctgacgt 1800
 attggcggcc tcggcgttct cctggtggag cacctgcctg aggaacacca ccaggcccac 1860
 ggcgacgcca aaaaatgcaa agttggccaa cacatagctc acaagaagta gtgccattgt 1920
 catcttctct cttgaagtct tcagttctgg gcttccctgg aaatggtggg tctgatcttc 1980
 agtgtgcaca aatgactcat tgtatatcat ggaattgcat ggagagcatg atcccacaga 2040
 tcaaacatct tccattggca ttttagaaat acctcgccat accggagata tcaaactggt 2100
 gatgttcttc cggcgggtgc cccaccaaga gaacgcctg gccaccaaca acatcagcat 2160
 atggatgggc accatcttca tctttgccct ctttagtgc ttcctagtgt attcctatac 2220
 ggggtgctac ttcacttggg tcatgttaca atttatcttc atcgtgatat atgctccttc 2280
 tgttctcaca taggtgatat cttaaaatgt atgaggcata tatacttctt acctaatatt 2340
 ataaagtata tgcccttata tagaatcaaa taaagcagaa aagtcattgt tattaccaat 2400
 cgtgtacttt tgttctaaac atctcaacta gtttaaagta tttgtctctc ttga 2454

<210> 10
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

5

<400> 10

aatcttattc tacatatttc tatcttata agaacaacta gcatagctct cgttgcccag 60
 ccagggtgcc cagccagggt gcctggtgca caatgagagc tggctagggc ggactcattc 120
 tgctgttggg gcccaacgat gctagctgct actcatacta gtgaagcctg ccatggttct 180
 gagaaatfff tggatactcc gctgcgtaga tatgcaacta aagcttgat gtttcgctga 240
 ctacatacta tggatatcac ctgtttgaca agagaaggat tacataccac gatgaagatg 300
 aattggaaca tgatgttctt cggcgggtg cccaccaag agaacgccgt ggccaccaac 360
 aacatcagca tatggatggg caccatcttc atctttgcc tctttagtgc tttccgtagt 420

10

ES 2 655 700 T3

```

gattcctata cggggtgcta ctccaacttgg atcatgttac aatttatctt catcgtgata 480
tatgtctcctt ctgttctcac ataggtgata tcttaaaatg tatgaggcat atatactttc 540
tacctaatat tataaagtat atgcctctat atagatcaaa taaagcagaa aagtcattgt 600
tattaccaat cgtgtacttt tgttctaaac atctcaacta gtttaaagta tttgtctctc 660
ttgaacaaaa aaaaaaaaaa aaaa 684

```

5 <210> 11
 <211> 564
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(564)
 <223> N es A, T, G o C

15 <220>
 <221> incierto
 <222> (1)..(564)
 <223> incierto en todas las n localizaciones

<400> 11

```

aatcttattc tacatatttc tatcttatat agaacaacta gcatagctct cgttgceccag 60
ccagggtgcc cagccagggt gcctgggtgca caatgagagc tggctagggc ggactcattc 120
tgctgttggg gcccaacgat gctagctgct actcatacta gtgaagcctg ccatggttct 180
gagaaaat tggatactcc gctgocgtaga tatgcaacta aagcttgtat gtttcgctga 240
ctacatacta tggatatcac ctgtttgaca agagaaggat tacataccac gatgaagatg 300
aattggaaca tgatgcaagt gatgtagcgc cccatatagg agtcactcag gaaagcacag 360
aagagggaga agatgtagac ggtgcccac cecatgctga cgctattggc ggccctcggcg 420
ttctcctggg ggagcacctg cctgaggaac accaccaggc ccacggcgac gccaaaaaat 480
gcaaagntgg ccaacacata gctcaactgca tcgncaagna gagctgcnta atcactgagg 540
gatatccatt tanntggnc ttct 564

```

20
 25 <210> 12
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> construcción sintética

30 <400> 12
 atcgtcggct acagcctcgg gaattctctg catgcgttg gacgtatgct cattcag 57

35 <210> 13
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> construcción sintética

<400> 13

	atcgtegggt acagectcgg gaattctgcc ccaccaagag aacgccgtct gcatgcgttt	60
	ggacgtatgc tcattcag	78
5	<210> 14 <211> 78 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> construcción sintética	
	<400> 14	
	atcgtegggt acagectcgg gaattcgggc gttctcttgg tggggcatct gcatgcgttt	60
	ggacgtatgc tcattcag	78
15	<210> 15 <211> 99 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> construcción sintética	
	<400> 15	
	atcgtegggt acagectcgg gaattctgct gatgttgctg gtggccacgg cgttctcttg	60
25	gtggggcacc tcgatgcgtt tggacgtatg ctcattcag	99
30	<210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> construcción sintética	
35	<400> 16 cggcgtctc ttggtgggc a 21	
40	<210> 17 <211> 939 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> construcción sintética	
	<400> 17	

ES 2 655 700 T3

```

aatcttattc tacatatttc tatcttatat agaacaacta gcatagctct cgttgcccag 60
ccagggtgcc cagccagggt gccctggtgca caatgagagc tggctagggc ggactcattc 120
tgctgttggt gcccacgat gctagctgct actcatacta gtgaagcctg ccatggttct 180
gagaaatfff tggatactcc gctgcgtaga tatgcaacta aagcttgtat gtttcgctga 240
ctacatacta tggatatcac ctgtttgaca agagaaggat tacataccac gatgaagatg 300
aattggaaca tgatgcaagt gatgtagcgc cccatatagg agtcaactcag gaaagcacag 360
aagaggggaga agatgtagac ggtgcccac cacaatgctga cgctattggc ggccctcggcg 420
ttctcctggg ggagcacctg cctgaggaac accaccaggc ccacggcgac gccaaaaaat 480
gcaaagtggg ccaacacata gctcactgca togtcaagta gagctgctta atcactgagg 540
gtatatacat ttagttcgcc ttcttcagcg ttgccatgga cctgggtgatg ttcttcggc 600
gggtgccccca ccaagagaac gccgtggcca ccaacaacat cagcatatgg atgggcacca 660
tcttcactct tgccctcttt agtgccttcc gtagtgatc ctatacgggg tgctactica 720
cttggatcat gttacaattt atcttcactg tgatatatgc tcttctgtt ctcacatagg 780
tgatatctta aatgtatga ggcatatata cttctactc aatattataa agtatatgcc 840
tctatataga tcaataaag cagaaaagtc attggtatta ccaatcgtgt acttttgctc 900
taaacatctc aactagtfta aagtattgt ctctctga 939

```

5 <210> 18
 <211> 312
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> construcción sintética

<400> 18

```

aatcttattc tacatatttc tatcttatat agaacaacta gcatagctct cgttgcccag 60
ccagggtgcc cagccagggt gccctggtgca caatgagagc tggctagggc ggactcattc 120
tgctgttggt gcccacgat gctagctgct actcatacta gtgaagcctg ccatggttct 180
gagaaatfff tggatactcc gctgcgtaga tatgcaacta aagcttgtat gtttcgctga 240
ctacatacta tggatatcac ctgtttgaca agagaaggat tacataccac gatgaagatg 300
aattggaaca tg 312

```

15 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> construcción sintética

<400> 19
 gcacagaaga gggagaagat g 21

25 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

ES 2 655 700 T3

<220>
 <223> construcción sintética

5 <400> 20
 tagacggtgc ccatccacat g 21

10 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> construcción sintética

20 <400> 21
 ctgacgctat tggcggcctc g 21

25 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> construcción sintética

35 <400> 22
 gcgttctct ggtggagcac c 21

40 <210> 23
 <211> 123
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> construcción sintética

50 <400> 23
 cccacggcga cgccaaaaa tgcaaagttg gccaacacat agctcactgc atcgtcaagt 60
 agagctgctt aatcactgag ggtatataca tttagttcgc cttcttcagc gttgcatgg 120
 acc 123

55 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> construcción sintética

65 <400> 24
 tggtagtgtt cttcggcgg g 21

70 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> construcción sintética

80 <400> 25
 tccgtagtga ttctatacg g 21

ES 2 655 700 T3

<210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 26
 10 ggtgctactt cactggatc a 21
 <210> 27
 <211> 210
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 20 <400> 27
 tgttacaatt tatcttcac c gtgatatatg ctccctctgt tctcacatag gtgatatctt 60
 aaaatgtagt aggcataat actttctacc taatattata aagtatatgc ctctatatag 120
 atcaaataaa gcagaaaagt cattgttatt accaatcgtg tacttttggtt ctaaacaatct 180
 caactagttt aaagtatttg tctctcttga 210
 <210> 28
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> construcción sintética
 <400> 28
 tgacatcaag tgatctatgc g 21
 <210> 29
 35 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> construcción sintética
 <400> 29
 45 tacacctgca tcttggcac a 21
 <210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 30
 55 tctcctggc gagcggcgca t 21
 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 655 700 T3

<220>
<223> construcción sintética

5 <400> 31
ttgtggatgc agaaagcggg g 21

10 <210> 32
<211> 939
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> construcción sintética

<400> 32

```

aatcttattc tacatatttc tatcttatat agaacaacta gcatagctct cgttgcccag 60
ccaggttgcc cagccagggt gcctggtgca caatgagagc tggctagggc ggactcattc 120
tgctgttggg gcccacgat gctagctgct actcactacta gtgaagcctg ccatggttct 180
gagaaatfff tggatactcc gctgcgtaga tatgcactaa aagcttgtat gtttcgctga 240
ctacactacta tggatatcac ctgtttgaca agagaaggat tacataccac gatgaagatg 300
aattggaaca tgatgcaagt gatgtagcgc cccatatagg agtcactcag gaaagcgcag 360
ctcggcaccg agatgcgccc aagatgcagg tgcattgctga cgctattggc ggctctgcat 420
agatcccttg atatcacttt gtggatgcag aaagcgggtgc ccacggcgac gccaaaaaat 480
gcaaagttgg ccaacacata gctcactgca tcgtcaagta gagctgctta atcactgagg 540

gtatatacat ttagttcgcc ttcttcagcg ttgccatgga caccgctctc tgcattcaaca 600
aagtgacatc aagtgatcta tgcgtggcca ccaacaacat cagcatacac ctgcatcttt 660
ggcacatctc cttggcgagc ggcgctttcc gtagtgattc ctatacgggg tgctacttca 720
cttggatcat gttacaattt atcttcacg tgatatatgc tccttctggt ctacatagg 780
tgatatctta aaatgtatga ggcatatata cttctacact aatattataa agtatatgcc 840
tctatataga tcaaataaag cagaaaagtc attggttatta ccaatcgtgt acttttgttc 900
taaacatctc aactagttta aagtatttgt ctctcttga 939
    
```

20 <210> 33
<211> 2072
<212> ADN
<213> *Oryza sativa*

25 <400> 33

ES 2 655 700 T3

gattctcccc tgcgcgcgcg ccgccgcgcg cgcctcaatc gggcgaagcc gcctcgcgcg 60
ccgtcgcggc ggcggcggcg agggcgagct cctgcgagag atcctccgcc gcctcatgcc 120
tcgcgcgcgc gctcccgcct ccgctctcgc ctgcagtatt tgttccattg ccgcgcacca 180
ctttccgggtg ggcggcgggc aatgctaggg gttaagagac cttctctccc cgagatggag 240
gcgcggggcg gcgcggcggg ggacgcggag gaggaagttg atgcccggat ccgctggggt 300
ccatggtggc tgctatggaa tgggtgaatt gcttggatgg ccacgaaggg gatcgacgcc 360
aattgtttgg cgacctctac gatagaatcg cgtcgagtcg ggggtgttctt tcctgttatt 420
actagaagta gttgaatttc gtgattgaac acacaaggaa gcttgatata gcgtcggggg 480
tgttctttcc tgttattact agatgtagtt gggtttcgtg attgaacacc taaggaaagg 540
aagcttgata aatggaagat agtccagcaa gttttgaaga tgatagaaaa tttgagcgcg 600
tcgtagtaac tgcctccac gatcacgcc agtggtgttc atggcatggg ggatggagtc 660
aggatccttg aggcgtctgc tcctgttgca ctgcttcatg cctttcctgc cttctaggat 720
gcttaagatg gttgcgaagt cagggtgctg ggagttcatg aagcggcat aatcaatttc 780
gctctctgta gtactttctc tgggtgtctc cccgttgett ccttttgaa gaaaagcgtc 840
ctttagaatc tcttgagaga gtgcacttcc tccctctcct gccatcagta gtgcctttat 900
tttcgcttgg tttccgcacc atcaggtggc acttatagaa attattttat ggaggaaaaa 960
gcattgtatg gcctgataga aatatactta tggataaaac taggacactt gcaagtgttc 1020
aatgggagtc acctaacctt ttttgctac ctgtctgcat ttcattgaatg ggattccttc 1080
tcctgcgcgc gtgctgtctt ctcaaatggg aatggaggc aagcatctgc cctgttccat 1140
gggtggcagcc atggaatgat gggatttctt tgatggcat aaaggagatc aaaaccaacg 1200
gttggcaatc tctgcagga tgatgaacca ggcttgtaat atctgttgct gatttctttg 1260
gaagacataa cggcaagctt catggggcac gatggatttc agatggttgc ttcagccatg 1320
tctcaagatt cagttgatgg acctcaagtt tctgggtgca gtgccacgag tcttggtcag 1380
cccaagagta agcgcaggac tggtgacaag gcaagagggg agaagaaggc actcaaagtt 1440
aagattaacc ttgccagccc ggccaaaaaa attaagaaaa gtagcaaaaa gaagggcaaa 1500
aagggcactg ttgctggcag gatagggaga aatgcactc tctcaagaga ttctaaaggg 1560
cgctttcttc caagagagag taagggggga gacatcggag gaaatgctac agagagttaa 1620
gttgattatg accgcttcat gaactttcag gcacctgact tcgctaccat ctttaagtatt 1680
ttgaaaggct ggaaaggcat gaagcaatgt aacaagatca ggcgcctcaa ggatcctgac 1740
ttcgtccctc tcatgaacgt catgagcaac actggatatg tgaccgagga tgatggtcac 1800
tatgatgtgc taaaagtctt gatgcatgca gatggctggg ctgcatagtg attcaagctc 1860
tcaaatcaaa acattcaggc ctatggcctt gttgctagaa cagtggtttc ttctttcacc 1920
tttaaaactt gatggacttt gttccattta tcttagaaat tttgttgccc ttgagtcagg 1980
tggatatgta ctggagtatg ctatactggg tgatttaatg gtgataatgt taaatcttga 2040
tactagtcca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2072

5 <210> 34
<211> 675
<212> ARN
<213> *Oryza sativa*

ES 2 655 700 T3

<400> 34

```

aguccagcaa guuuugaaga ugauagaaaa uuugagcgcg ucguaguaac ugucguccac   60
gaucacgucc aguguuguuc auggcauggg ggauggaguc aggauccuug aggcgucugc   120
uccuguugca cugcuucaug ccuuuccugc cuucuaggau gcuaaagaug guugcgaagu   180
caggugcuug ggaguucaug aagcggucau aaucuuuuc gcucucugua guacuuucuc   240
uggugucuuu cccguugcuu ccuuuuggaa gaaaagcgcg cuuuagaau ucuuagagaga   300
gugcacuuuc ucccucuccu gccaucagua gugccuuuau uuucgcuugg uuuccggcaa   360
aaagggcacu guugcuggca ggauagggag aaaaugcacu cucucaagag auucuaaagg   420
gcgcuuuuuu ccaagagaga guaagggggg agacaucgga ggaaaugcua cagagaguga   480
aguugauuuu gaccgcuuca ugaacuuuca ggcaccugac uucgcuacca ucuaaaguau   540
uuugaaaggc uggaaaggca ugaagcaaug uaacagauca ggcgccucaa ggauccugac   600
uucgucccuc ucaugaacgu caugagcaac acuggauaug ugaccgagga ugauggucac   660
uauaugugc  ugaaa                                     675

```

```

5  <210> 35
   <211> 21
   <212> ARN
   <213> Oryza sativa

10 <400> 35
   ucacguccag uguuguucau g          21

   <210> 36
   <211> 21
   <212> ARN
   <213> Oryza sativa

15 <400> 36
   gcauggggga uggagucagg a          21

   <210> 37
   <211> 21
   <212> ARN
   <213> Oryza sativa

20 <400> 37
   uccuugaggc gucugcuccu g          21

   <210> 38
   <211> 21
   <212> ARN
   <213> Oryza sativa

25 <400> 38
   uugcacugcu ucaugccuuu c          21

   <210> 39
   <211> 21
   <212> ARN
   <213> Oryza sativa

30 <400> 39
   cugccuucua ggaugcuuaa g          21

   <210> 40
   <211> 21

```

ES 2 655 700 T3

<212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

 5 <400> 40
 augguugcga agucaggugc u 21

 10 <210> 41
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

 15 <400> 41
 ugggaguuca ugaagcgguc a 21

 20 <210> 42
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

 25 <400> 42
 uaaucaauuu cgcucucugu a 21

 30 <210> 43
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

 35 <400> 43
 guacuuucucuggugucuucc 21

 40 <210> 44
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

 45 <400> 44
 ccguugcuuc cuuuuggaag a 21

 50 <210> 45
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

 55 <400> 45
 aaagcguccu uuagaaucuc u 21

 60 <210> 46
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

 65 <400> 46
 ugagagagug cacuuucucc c 21

 70 <210> 47
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

 75 <400> 47
 ucuccugcca ucaguagugc c 21

 80 <210> 48
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

ES 2 655 700 T3

	<400> 48 cacuguugcu ggcaggauag g	21
5	<210> 49 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Oryza sativa</i>	
10	<400> 49 gagaaaaugc acucucucaa g	21
15	<210> 50 <211> 20 <212> ARN <213> <i>Oryza sativa</i>	
20	<400> 50 agauucuaaa gggcgcuuuc	20
25	<210> 51 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Oryza sativa</i>	
30	<400> 51 uuccaagaga gaguaagggg g	21
35	<210> 52 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Oryza sativa</i>	
40	<400> 52 gagacaucgg aggaaaugcu a	21
45	<210> 53 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Oryza sativa</i>	
50	<400> 53 cagagaguga aguugauuau g	21
55	<210> 54 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Oryza sativa</i>	
60	<400> 54 accgcuucau gaacuuucag g	21
65	<210> 55 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Oryza sativa</i>	
70	<400> 55 caccugacuu cgcuaccauc u	21
75	<210> 56 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Oryza sativa</i>	
80	<400> 56 uaaguauuuu gaaaggcugg a	21

ES 2 655 700 T3

<210> 57
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*
 5
 <400> 57
 aaggcaugaa gcaauguaac a 21
 <210> 58
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*
 10
 <400> 58
 gaucaggcgc cucaaggauc 20
 <210> 59
 <211> 27
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*
 20
 <400> 59
 cugacuucgu cccucucaug aacguca 27
 <210> 60
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*
 25
 <400> 60
 ugagcaacac uggauaugug acc 23
 <210> 61
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Zea mays*
 35
 <400> 61
 uccuugaggc gucuguccu g 21
 <210> 62
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Zea mays*
 40
 <400> 62
 uugcacugcu ucaugccuuu c 21
 <210> 63
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Zea mays*
 45
 <400> 63
 ugggaguuca ugaagcgguc a 21
 <210> 64
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Zea mays*
 50
 <400> 64
 ugagagagug cacuuuccc c 21
 <210> 65
 <211> 21

ES 2 655 700 T3

<212> ARN
 <213> *Zea mays*

5 <400> 65
 caccugacuu cgcuaccauc u 21

10 <210> 66
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

<400> 66

aguccagcaa guuuugaaga ugauagaaaa uuugagcgcg ucuaguaac ugucguccac 60
 ga 62

15 <210> 67
 <211> 30
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

20 <400> 67
 gaggaugaug gucacuauga ugugcugaaa 30

25 <210> 68
 <211> 31
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

30 <400> 68
 uuuuuuuucg cuugguuucc ggcaaaaagg g 31

35 <210> 69
 <211> 898
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

<400> 69

aatcttattc tacatatttc tatcttatat agaacaacta gcatagctct cgttgcccag 60
 ccaggttgcc cagccagggt gcctggtgca caatgagagc tggctagggc ggactcattc 120
 tgctgttggg gcccacgat gctagctgct actcatacta gtgaagcctg ccatggttct 180
 gagaaatfff tggatactcc gctgctaga tatgactaa aagcttgtat gtttcgctga 240
 ctacatacta tggatatcac ctgtttgaca agagaaggat tacataccac gatgaagatg 300
 aattggaaca tgatgcaagt gatgtagcgc cccatatagg agtcactcag gaaagcacag 360
 aagaggggaga agatgtagac ggtgcccac cecatgctga cgctattggc ggctcggcg 420
 ttctctgggt ggagcacctg cctgaggaac accaccagge ccacggcgac gccaaaaaat 480
 gcaaagttgg ccaacacata gctcactgca tegtcaagta gagctgctta atcactgagg 540
 tatatacatt tagttcgct tcttcagcgt tgccatggac ctgggtgatgt tcttcggcg 600
 ggtgccccac caagagaacg ccgtggccac caacaacatc agcatatgga tgggcaccat 660
 ctctcatctt gccctcttta gtgctttccg tagtgattcc tatacggggg gctacttcac 720
 ttggatcatg ttacaattta tcttcacgt gatatatgct ccttctgttc tcacataggt 780
 gatatcttaa aatgtatgag gcatatatac tttctacctt atattataaa gtatatgcct 840
 ctatatagat caaataaagc agaaaagtca ttgttattac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 898

ES 2 655 700 T3

5 <210> 70
 <211> 892
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> construcción sintética

10 <400> 70

```

  ggtaccaatc ttattctaca tatttctatc ttatatagaa caactagcat agctctcgtt .60
  gccagccag gttgccagc caggtgcct ggtgcacaat gagagctggc tagggcggac 120
  tcattctgct gttggtgcc aacgatgcta gctgctactc atactagtga agcctgccat 180
  ggttctgaga aatttttggg tactccgctg cgtagatatg cactaaaagc ttgtatgttt 240
  cgctgactac atactatgga taccacctgt ttgacaagag aaggattaca taccacgatg 300
  aagatgaatt ggaacatgat gcaagtgatg tagcgcacca tataggagtc actcaggact 360
  ccacggcat tgtgtatcat gtagacgggtg cccatccaca tgctgacgct attggcggcc 420
  ttggtccttc atagagacc aacctaacag tgaacgtact gtgcgccac gccgacgcca 480
  aaaaatgcaa agttggcaa cacatagctc actgcatcgt caagtagagc tgcttaatca 540
  ctgaggata tacatttagt tcgccttctt cagcgttgcc atggagcgc agaacgttca 600
  cggttagggt gtgtctctt gaaggacat gccaccaac aacatcagca tatggatggg 660
  caccatcttc atgatgaaca atgacgggtg agtcctgagt gattcctata cggggtgcta 720
  cttcacttgg atcatgttac aatttatctt catcgtgata tatgctcctt ctgttctcac 780
  ataggtgata tctaaaatg tatgaggcat atatacttcc tacctaatat tataaagtat 840
  atgcctctat atagatcaaa taaagcagaa aagtcattgt tattacgtta ac 892
  
```

15 <210> 71
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> construcción sintética

<400> 71
 tggacaacg tcattgatga c 21

25 <210> 72
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> construcción sintética

<400> 72
 tggacctac atggcccttc a 21

35 <210> 73
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>

ES 2 655 700 T3

<223> construcción sintética

<400> 73
 taattgtgca gctcatcacc c 21

5

<210> 74
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> construcción sintética.

<400> 74
 tagatgggaa atatagatat c 21

15

<210> 75
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> construcción sintética

<400> 75
 tgcttatatg tatgttctgt a 21

25

<210> 76
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> construcción sintética

<400> 76
 tcaagagtct ttgaaagaaa g 21

35

<210> 77
 <211> 880
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> construcción sintética

45

<400> 77

aatcttattc tacatatttc tatcttatat agaacaacta gcatagctct cgttgcccag 60

ccaggttgcc cagccagggt gcttggtgca caatgagagc tggctagggc ggactcattc 120

tgctggttggg gcccaacgat gctagctgct actcatacta gtgaagcctg ccatggttct 180

gagaaatttt tggatactcc gctgcgtaga tatgcactaa aagcttgtat gtttcgctga 240

ES 2 655 700 T3

ctacatacta tggatatcac ctgtttgaca agagaaggat tacataccac gatgaagatg 300
aattggaaca tgtggacctt acatggccct tcaatatagg agtcactcag gagtcatccg 360
tgacgttata ccagacatcc atatttccca tccactttct cttagagacc cttgtgggtg 420
atgagttgca cagttacctg cttatatgta tgttctgtac ccacggcgac gccaaaaaat 480
gcaaagttgg ccaacacata gctcactgca tcgtcaagta gagctgctta atcactgagg 540
tatatacatt tagttcgctt tcttcagcgt tgccatggat acagaaaata catatcagcg 600
ggtaattgtg cagctcatca cctcaagag tctttgaaag aaagtagatg ggaaatatag 660
atatctggta caacgtcatt gatgactcag tagtgattcc tatactgaag ggccacgtaa 720
gggtgcacatg ttacaattta tcttcacgt gatatatgct ccttctgttc tcacataggt 780
gatatcttaa aatgtatgag gcatatatac tttctaccta atattataaa gtatatgcct 840
ctatatagat caaataaagc agaaaagtca ttgttattac 880

5 <210> 78
<211> 21
<212> ARN
<213> *Oryza sativa*

10 <400> 78
gugagaaagu gccucucuc a 21

15 <210> 79
<211> 2040
<212> ADN
<213> *Oryza sativa*

<400> 79
ccacgcgtcc gccaaaagtg aactgtgaac cggacgatcc aggcattccag ctaaccgctt 60
ccccctcgtc gcgctcgcg cgcgcgcgcg ctcgcctcca ccagctacgc cgtcacgcga 120
gctcacggcc cgggggectc ggaagcacia ccaccacgcg tccacgccga agccacgagg 180
agagcctgtc tctcctccgg ggattctatc gccggctggt ctcagcggcg ccaactggag 240
caggcggcac ccgctccgta ctgctgctga tttggtgagc gcgggcagcc gcgggatggg 300
agatctgggt gcgtgatggt gagcccgggc agtaaccggg gcggcctgtc gcgcgtatcg 360
acgcggggcg gcgtcgccgg gccggggagc ccgcgcgctt ctctgcccgc gaccgctttc 420
gcggcgctac ggcgcagggt gcgggtggcg cccccggct cgtcgacgct ggagcgcgcg 480
gcccgcgctt tctgctggc ctccgcagcg ctgctgctct cctgocgct ctacctctac 540
gtgctgcgct acgtcggccg gggaggctgc gccttcgccc ccgcgggctt cgtcggggac 600
gccgtcctgg gcctcggcgg cgagccgtgc gacgtgttcg acggcgcctg ggtgcccgc 660
gacaccggcc tccgccgct ctacaatagc tccgggtgcc cgttcgctga gcgcgggttt 720
gactgcctcg ccaacggggc gaacgacact gggtaacctc agtggcgggt gaagccgcgc 780
cgggtcggcg tgcgcgggtt tgcggcccgc accgcgctgg agcggctgcg cgggaagcgg 840

ES 2 655 700 T3

gtggtgttcg tgggggattc catgagccgc tcgcagtggg agtccttcat atgcatgctc 900
atggccggcg tggatgacce caggacggtc ttcgaggtga acgggaacga gatcaccaag 960
acgatacgcc acctggcggg cagggttcgcg tctcacggcc tcaccgtgga attcttccgg 1020
tcogtgttcc tcgtgcagga gcatcctgcc ccgcggcatg cccccaagag ggtcaaatec 1080
actttgaggc ttgacaggat ggataatttc agccggaaat gggtcaatte ggacgtactg 1140
attttcaaca ctgggcattg gtggacaccg accaaattgt ttgatacggg ttgctatttt 1200
caggctggac gttctcttaa attaggtaca tccattgatg ctggtttcag gatggcactg 1260
gagacctggg cctcatgggt acaaaaaaga gttgatttaa accgaacaca tgtattcttt 1320
cgcacatatg agccatcgca ttggggggat acaagccaaa aggtgtgtga ggtaacagag 1380
cagccttcat cagaggccaa aggaaatgat aagagtgaat ttggggctat acttgctgat 1440
gttgtaacca acatgaaagt tcctatcaca gtactaaatg taactttaat gggatcgttt 1500
cgaagtgatg cacatgttgg cacttggagt taccctcca ctatacttga ttgcagccac 1560
tgggtgtctc ctggagtcce tgatgcttgg aacgaactcg tgttttcgta ccttttgaca 1620
aatggttggc gaaacatggc gggctgaatt ttttggcagc acaatctacc cgcacctatt 1680
gcatttgtat atttgacatt accaggtata ctagagaatt aacatacgtc cgggacaagg 1740
cagctgcagc tgctaggtgg ttcactggac ttctacattc tttcttctt tttgattttt 1800
gactcgtata cacggtgaag catgctacat gcaactagag ttgtatgtag ttggtaaggg 1860
attagaaggc cttggcattc gttctatttg ctcaatttac taacggttca ttttattatg 1920
ttgttaaaaa tcgagtttgt attgtaacct gtatgtacaa acatttactt gatacattgt 1980
gagaaagtgc cctctctcaa ttggattgat aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2040

5 <210> 80
<211> 21
<212> ARN
<213> *Oryza sativa*

10 <400> 80
ggcgaaggu gaacucucuc a 21

<210> 81
<211> 2523
<212> ADN
<213> *Oryza sativa*

15 <400> 81

cggacgcgtg gggcgtgctt ggtctctctc ctctcgtggc gacgaccgag cggccgtcgc 60
tgcttacgtg cccagtcctg ttcgtccctt cgcggcgac ggccacgacc tggttatagg 120
caaagtttgt cctgaactgt tcatcatggt ggaaggctgg gtattctctg ctttgttagt 180
ggtgtttcta gegttcacia caccttgcga gtcattctac ttgccaggta gttatatgca 240
cacatatcag caaggtgaag taataagggc gaaggtgaac tctctcactt ccattgagac 300
agaactacc ctcagttact acagccttcc atactgtcgt cccagagatg gggttaagaa 360

ES 2 655 700 T3

gagtgcctgaa aacttaggcg agcttctgat gggatgatcaa atagataatt ctccgtaccg 420
tttccgtgta aatgtcaacg aatctctgta tctgtgtact acaacccac ttgacgaggc 480
taatgtgaag ctctcaagc agcgtagcca tgatctatac caggatgaaca tgattcttga 540
caatcttctt gtgaggaggc tcacagagca gaatggaata accatccagt ggacaggcta 600
tccagttggt tatattccag aaggcacttc tgatgtctac atcatcaatc acctgaaatt 660
taaggtcttg gtccataagt atgaaggagg cgaagtaaag gtagttggga ctggggaagg 720
aatggaagtg atctcagaga ctgacaaaga tgccaattct ggatattgaga ttgtgggatt 780
tgaagttgtc ccatgcagcg tgaagcgtga tcttgaatcc atattgaagc ttaatattga 840
tgataaagtc gatcctgtga actgcctgtt ggagttggaa aaatctcaat tggttaggga 900
gaaagagaag attactttta cttatgaggc tgaatttgta aacagtgata tcaggtggcc 960
atcacgggtg gatgcatacc tgaagatgga gggttcgaag attcactggt tttcaattat 1020
gaactctttg atggtaattc ttttttggc tggcattgta tttgtcatat tcttgcgtac 1080
agtgaggagg gacttgactc ggtatgagga gttggataag gaggcccaag ctcatatgaa 1140
tgaggagctc tctggttggc agcttgttgt tggagatgtc ttcagagaac caacctcacc 1200
gaagctgtc tgtgtcatga ttggcagatg ggttcagatt ttgggtatgg caattgttac 1260
cattttcttt gccgcatttg gcttcatgtc tcttgcacgc agaggaatgt tgttgacagg 1320
gatgatagtc ttttatatgt tacttggaa tgtgtctggg tatgctgctg tcaggctctg 1380
gaggacttta aaaggaacgt ccgagggatg gaggtctgtc tcttggtaa ctgcttgttt 1440
cttccctggc attgtcttca ttgtcctcac tgtgttaaac ttcattgctg ggacaagaaa 1500
tagtactgga gcccttccca tctcactttt ctttggcctt ttgtccttgt ggttctgtgt 1560
ctccgtgcca cttacccttt taggtggttt ctttggcaca agggctgagc caatagaatt 1620
ccctgttcga accaatcaga taccaagaga aatccctacg aagaagtact cattgctctt 1680
catacttggc gctggaactc taccttttgg aacactcttc atcgagctct tcttcattct 1740
ttctagtatt tggcttggaa ggttctatta cgtgtttggc ttctccttg tctgtctctt 1800
tttctgtgatt gtggtgtgtg ctgaggtatc agttgttctt acctacatgc atctctgcgc 1860
ggaggactgg aggtggtggt ggaaagcttt ctttgttctt ggaacagtgg ccctttatgt 1920
gttctcttac tctatcaact acttgggtgt tgatctcaga agcttgagtg ggccagtctt 1980
tgctattctc tacattggat actctttctg tgtctcctt gccattatgc tagcgactgg 2040
taccgttggc ttctgacgt cgttctcttt tgtccactac cttttctcat cagtcaagat 2100
tgattgaaga tccaggttg tctttacaca aatcaccctg tgagctcaaa tgatattgacc 2160
attgcatctt gaaggccttt cacagagcag tgctgtttgt aatgtagctt attaccgaga 2220
gtctgagact gctgtacctt gtaatgaata gtatatttca gcagatgtgt tttgaagttt 2280
gtcacacttt getacagcat tttgttgacc tgccaatact gtaggaaaag tcttgcgttt 2340
attatcccat ggtgccattt tgtgtctgt ttctttctgc aagattggct tgcagctgga 2400
gaactatagc ttcttatggt ataacttaca tgtgcaaaat gtttcccatc caaaaaaaaa 2460
aaaaaaaaatca gttcagaagt caccttcttt cgtgaatggt ttgattccct gaggctactt 2520
tat 2523

ES 2 655 700 T3

<210> 82
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*
 5
 <400> 82
 gccagaaggu gcacugucuc a 21
 10
 <210> 83
 <211> 530
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*
 15
 <400> 83
 gcagatgata gacacgacta aagattacat tcaagcgcctg agcattgtgc cgacaagaga 60
 gttggccttg cagacgtctc agattttcat cgaagtttca aagcacttga aagcccgcgt 120
 gatggtgacc accggaggca cgaatttgaa ggacgacata atgcgtatat acgaaaacgt 180
 tcacgttatac attgcgactc ceggtcgcac actcgatctg atggagaaga aggttgccaa 240
 gatgaacaac tgtcaaatgc ttgttctcga cgaagccgac aaacttctgt ctcgggattt 300
 ccaggggctc ctcgatcgag tcatctcgtt cttgccgcaa gaaagacaaa tcttctctca 360
 ttcagctacg ttcccgatga cegtgaaga attcatgcgc cgtcacctca agaacgccta 420
 cgagatcaac cttatggagg agctcacact caagggagtg acacagtact acgctttcgt 480
 acaggaacgc cagaagggtgc actgtctcaa cacgcttttc tcgaaacttc 530
 20
 <210> 84
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*
 25
 <400> 84
 ggaaggccua agcagugcaa 20
 30
 <210> 85
 <211> 2229
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 85
 atggcttcaa gggcggctcat cagaagaagg aagtatcttt tggatcatgt taacgcacct 60
 accctctcat tgtccccctt ctctaccttc caacatggaa gatctggttc tgaggatgaa 120
 tcaagaatcg gacagcgatt tcttgagcaa agctctgggg attccaaatg ggagcaaggg 180
 cagtatggtg tgaattgat aaagggagat ctactagccc ttggtaatgg gcttctgcgg 240
 cgcccagccc atgggatttc tctacctget tatggaattg gaaggaagga atttggggtg 300

ES 2 655 700 T3

cctatgggtg ctagacattt gctgcagtca gtccgcacag cctcaactgc aacagctggg 360
 caacctaagt tggatattga agatgaacag agtgaggatc agaaacagaa caaaaggaaa 420
 aaggaggcat cccagaaga atgtgatcag gctgtggaag gcctaagcag tgcaaaagct 480
 aaagccaaag ctaagcaggt acaagaatct gtaaaggctg gccaatcaat tgtacgaaaa 540
 ttctgggcca ggcttctggg tattggtcct gctctccgag ctggtgcttc gatgagcaga 600
 gctgattggg ctgcaaagct gaagcactgg aaggatgaat ttgtgtcaac gctgcagcat 660
 tactggttag ggacaaagct actctgggca gatgtgagga tttcgtcaag attactggtg 720
 aaacttgctg gtggaaagaa cctttcaaga agagagagac aacaactgac ccgtacaaca 780
 gcagatatct tcaggctggt accttttgct gtgttcatca ttgttccatt catggagttc 840
 ttacttccag tgttccctca gttatttcca aatagtcttc cctcaacttt ccaagacaag 900
 atgaaagaag aggaagcgtt gaaaaggaaa ctgaaagcaa gaatggagta tgccaagttt 960
 ttgcaagata ctgcaaaaga aatggcaaag gaagttcaaa catcacgtag tggagaaata 1020
 aaacaaacag ccgaagatct tgatgaattt ttgaacaagg ttaggagagg tgaacatgtc 1080
 tcaaatgatg aaatcttgaa cttcgcgaag ctgtttaatg atgagctgac tttggataac 1140
 atgagcagac cacgcttggg aaacatgtgc aaatatatgg gtattcgacc tttcggtact 1200
 gaccactact tgaggttcat gcttcgcaaa aaactgcaag acattaagaa tgacgataag 1260
 atgattcaag ctgagggtgt tgagtctctc tctgaagagg aacttcggca agcctgtcgt 1320
 gaacgtggtc acctaggttt gctgtcaaca gaagaaatgc gccaacagct ccgagattgg 1380
 ttggatctct cacttaatca tgctgtgcca tcctctcttc tcatacttctc aagagctttt 1440
 accgtatctg ggaaaatgaa gcctgaggag gctgtgtgtag caaccttate ttctctacca 1500
 gatgaagttg tggatacagt tgggaccgta ttgccatctg aagattcggg ttctgagagg 1560
 aggagaaaac tggaaatcct tgagatgcag gaagaactta tcaaggagga agagaagaag 1620
 aaagagaaag aagaaaaagc gaaacaagag aaagaagaaa aggccaaact caaagaacca 1680
 aaggctgctg aagaagattt ggctttgaa gaaatgactg gtccactgct tagggaagaa 1740
 gaagaactga gagaagcaaa acagcacgat aaggaaaagc tctgtaattt tagtccagca 1800
 ctggctgtac tggcatccgc atcgtctggt agcaaggagc gtcaagagtt cctcagcctt 1860
 gtcaacaaag agattgaact gtataactct atgcttgaaa aggagggtag agaaggtgaa 1920
 gaggaagcta agaaagctta catggctgct agagaagagt cggacaaggc tgctgaggtt 1980
 gatgaagaag aaaaggctct atcggcgctg attgagaagg ttgatgctat gctccagaaa 2040
 ttagaaaagg agattgatga cgtggatgca caaattggaa accgatggca aattcttgat 2100
 agggatcttg atggcaaggt gactcctgag gaggtagcgt cagcagcagc ttatctgaag 2160
 gatacaatag gaaaggaagg cgtccaagag cttgtcagca acctctctaa agacaaaggt 2220
 cctccctga 2229

<210> 86
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

5

<400> 86
 gaaaucaug gaagcagugc ag

22

10

ES 2 655 700 T3

<210> 87
 <211> 1521
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

5

<400> 87

```

atggccgcct cctcttcctt cctcgccgcc ggccgccgcc tgatccgct cggtgcggc 60
aggctcctcc ccgcccggcca cgcgcgatcc catggctcca cccctgccct cattcgagcc 120
gccgcccgcg cctcctcccc cgcctctcct cgcggccaca gcggggggag gaagccggcg 180
cggcccccca gcctgcagtc cacgctgtgg ccgctgggce acccgggca cctcctggtg 240
ccggagatcg agcgggtggc ggccaagcca ggcaaccgcc tccgccacgt cgagctcgag 300
cgcacgtca aggagctccg caagcgacgc cgcaccgcc aggcctcga ggtctctgaa 360
tggatgaatg ccaagggaca tgtaaaattt ctgccaaagg atcacgctgt tcacctggat 420
ttgattggtg aaattcatgg aagcagtgca gccgagactt acttcaaca cctgccagat 480
aaagataaga cagaaaaacc ctatgggtgca cttcttaact gctacacacg ggaactcctg 540
gttgaaaaat cgttggctca ttttcagaag atgaaagagt tgggttttgt gttttccaca 600
ctcccctaca acaacatcat gggctctgat acgaacctag ggcagcatga aaaggttctt 660
tcagtaattg cagagatgaa aagcaatggt atcgttcctg acaatttcag ctacagaata 720
tgcattaact cttatggcac aagggctgat tttttcggga tggaaaacac ccttgaagag 780
atggagtgtg aacctaaaat cgttgttgat tggaaacacgt atgctgtcgt ggcaagcaac 840
tacattaagg gcaacataag ggagaaagca ttctctgcct taaagaaagc agaagcaaaa 900
ataaatataa aagattcaga ttccataaac cacctgattt ccttgtatgg acatctgggg 960
gacaaatcag aggtcaatag gctgtgggcg ctccaaatgt cgaactgcaa taggcatatt 1020
aataaggatt aactacaat gcttgcagtg ctcgtgaaac ttaatgagat tgaagaagct 1080
gaagtgttgc tgaaagagtg ggagtcgagc ggaaatgcat ttgacttcca agttccaaat 1140
gtcctgctca ctggataccg ccagaaggac ttgctggaca aggctgaggc acttctggat 1200
gatttcttga agaagggaaa gatgcctcct tcaaccagct gggcaattgt ggcagctggc 1260
tatgcccaga aaggtgatgc tgcgaaagca tatgagctga caaagaatgc cctatgtgta 1320
tatgctccaa atactggttg gatccctagg cctgggatga ttgagatgat acttaagtat 1380
cttggagatg aaggtgatgt cgaggaggtt gaaatthtcg ttgatctgct gaaagttgct 1440
gtgccactga actcagatat gactgacgct ttgtcaaggg ctcgaatgag agaagaaaag 1500
aaggttaaag atgcagtgta a 1521
    
```

10 <210> 88
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

15 <400> 88
 ggaaggccug aagcaugcaa 20

20 <210> 89
 <211> 1980
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

<400> 89

```

cgtgcctttt cegtcgtccc atctgccagg ggggaacggc aaagggcacc gtcgcaaaca 60
atcaagttcc acaaactcgc atctcatctg cttcgactcc accgaggact cccttctttc 120
ctcccactcc catctgtctt cctcgccgcc acctgcgccc tcagagcacg gagcagtcgg 180
cgaccacgct ttcgctgccc ctctccgaca ggcgacggag ccgcagctcc agtcgcagtc 240
ggctcccctg aattcgggct cgccaaatac cctccaatcg tctgcgtccg tcgtccggga 300
cttccggtgc aactgaatcc ggcaccacct gtgcggcctg tcatggcact tggaaagagga 360
gggaggaagg actcaagagg ttaaggtacg gtatttatag atttggtga agaaactggt 420
tgttgctatt atgaagacta agacgagtag gagcttacag aagtctggga gaggtaacca 480
tgtccaagga gaagggccaa actgggttct tgttgctggc ggggttttgc ttagcacgct 540
ttcagtcaag gttgtgtgca aactaaagca gttgttagac ggaagcagc aaaataatac 600
tttcgaagct aaaggaaggc ctgaagcatg caagctgcat tcagatctct accggctcag 660
tgaccaaact ggctgctact actgtatgtc agggcttgca aatgggtggag tggaaagtaa 720
gcaagcacca gcaagtctct taccacaatc agttgaatcc tcaactccac ttgtcaagat 780
accacacca gaatcaagca aagagaacag cgggtgtatg tggatatact cacctgatcg 840
gctgaaagat cctcgaaggc catttcagta ctctaacagt tctggctctc cctgtgtttc 900
agaatcagga tctgacattt atggcaaaag agaggtcata cagaagctaa gacagcacct 960
caagaaacgt gatgagatga tcatggagat gcaaacctcag attgctgac ttaagaactc 1020
tcttaacatt caggtgacac agtccagcaa tctgcagtct caattggatg ctgccaatcg 1080
tgatctgttt gaatctgaac gagagatca gcatctaagg aagattattg cagatcattg 1140
tgtcacagaa gcactctctc atgataaacc tttgcaagct gcgcattggc agccagatgc 1200
cgcaaatggg cattctaag gctatggtga tggttgtgtt gatgatgctg acctgcattg 1260
tattagcatc gagaagagga aggtagaagt agagaggggtg gagatgctca agaaagaggt 1320
ggttgaactg aaggaagtca ttgagggaaa ggactttgtg cttcagagct acaaggaaca 1380
gaaggtggaa ctcttctcaa agatcagggg gttgcaggaa aagctctcag cacaagtgcc 1440
aatcatcttg taggatctat ctgtgatact ttttagaaga ttgaatctaa gcataatggt 1500
gccatgtccc atgagcagca gaggggtccc cgcttcagtg aagattgcag aaggtcttgg 1560
catttggcaa tcgtcacgca tgccaaacac catgctagga tctttgtgga atgcttctct 1620
tttcttttga ggggagcttt gcataatggt aggttgattt gtttcttct tggttgtcat 1680
aatggttaggt tggtttgcct tcttcttct tcaatateta gcccttgggt gctcaaagtt 1740
taciaaagga ttctttttt cagttgctag gcctcaggta actcaattga acttcatact 1800
caagttgctg tacaggttct cagatttcag gagacacaga agtctgtact gtgcctctgc 1860
ctctgtttc atgctttttt ttgttaagt gatctttgga atgttaggtc catgacattt 1920
ctactatgag atttgaagac tatggcattg cccttttttg tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980

```

5

<210> 90
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

10

ES 2 655 700 T3

<400> 90
 uggcugcuac auggacuccc g 21

5
 <210> 91
 <211> 1125
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

10
 <400> 91
 atggccggag acacgacgaa gcccacggag tcagccatcg tcgggagcac ggtgaccggg 60
 caccacctgc tccacatcga cggctactcc cacaccaagg accgcctccc caatggctgc 120
 tacatggact cccgcccttt caccgtggga ggccatctat ggcgcatcgg atactacccc 180
 aacggcgacg tcgccgacgc ctccgcgtac atggccgtct acccttccat cgacgagaac 240
 gtcacgtcgc ccgtcaagge ttttgccaag ttcagcttgt tcttcaacgg cgagcccacg 300
 ccgccggcgt ttgtgcatac cacagagcca ttcgtgttca gcaggaaggg gatcgggtat 360
 ggttttagca agtatgccga gagggagttg atggagggct cgatcgtgga cgacaagttc 420
 accatcaggt gcgacgtcgg cgtctccacg gagctccgcg cggaggacag gccgccgtcg 480
 gacttcgcgg cggtggtgcc gccgtccgac ctgcaccggc acctcggcga ccttctggac 540
 tccaagcacg gcgccgacgt cacgttccag gtcggcggcg aggcgttccg cgcgcaccgg 600
 tacgtectcg cggcgcggtc gccggtcttc agggcggagc tgttcggcgc catgagggag 660
 gccaccgccg cggccgcgcg gtcgtcgtcg gactcggagg cgatccgcgt ggacgacatg 720
 gaggcgcggg tgttctccgc tctgctccgc ttcgtgtaca ccgacgcgtt gccggcgccc 780
 ggcggagcgg acgacggaca agcggcagga ggaggatcgt attcggagga ggccgccatg 840
 gctcagcacc tgctcgtcgc ggcggacagg tacgacctga agaggctgaa gctgctctac 900
 gaagacaagc tacgcaggca catcgaagcc gcctccgccg cctccatgct cgcggttggt 960
 gagcagcacc attgccgagg cctcaaggag gcggtgcttg tgttcctcag ctccgccggc 1020
 aaccttcacg ccgccatggg aagcgatgga tttgagcatt tatccaggag ctgccccggt 1080
 gtgatcaagg agctaataac caaacttggt ccacgttggt attag 1125

15
 <210> 92
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

20
 <400> 92
 aggccuuuuc augaacuccc a 21

25
 <210> 93
 <211> 578
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

<400> 93

ES 2 655 700 T3

```

tggcgcgggac tcatggggaa cggtgacgcg cctcctgtct tgttttcctt tcatggcgcc 60
gaccctcgcc gacgggtgat cgacgtcgcc cctattcatt tgcttgatgg tccccccca 120
tacgccgatg ctcacgcacc tcctccttct atctccttac agacgcgggg acgctcgccc 180
acggcgggcg cgggagctga gtcttctgtc agcacgctcc tcgaggtgcg cggactcacc 240
gaatacgtga aggagactgg gcagctgaat cctagccggc gatcacctta ccatccgcga 300
gggcgagatt catgctatta tggggaagaa cggctgcggc aagagcaacc ctcaaaaag 360
gtctcactgg gcagtctcat tatgaggtga cgggtggcac cttctcgtg gagggggggg 420
acctggttga catggagcca tatgacagac ctctagcagg ctttttcatg aactcccaag 480
cacctatgtg agattcctga atcaacaatt tcgattttgt gctatggctg cgaatgctcg 540
ctaagaaagg aatggtctac cagcattggg ggcccttg 578

```

5 <210> 94
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Oryza sativa*

10 <400> 94
 ggcgucgcc uucgcaacca u 21

<210> 95
 <211> 1188
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

15 <400> 95

```

atgaggcaca agcagaagac cctccctgc acagtgcaca cgatactagc tagcccgatg 60
gccccaacct ccagcgttca ccgcgaaggc ggcagcgccg ccatggacat ggccgagctc 120
atccccacgc tgccgctgga gacggggagc ccgcccgttc cgctccggca atacggcggc 180
tactggctgc cggagtggtt cctccctggg ctcgaggccg tgcacacgcg ctctcgagccg 240
aggccatccg acgtcttctt cggcagcttc cccaagtccg gcaccacctg gctcaaggcg 300
ctcgccttgc caaccatcaa ccggaccacc taccgcgctt ccggcgagcg ccaccgcctc 360

```

ES 2 655 700 T3

cgccatcgcg gcccgcacga ctgctcaag ttcttcgagt ccaccttcgc catctccggc 420
gagggcggcg ggggagacgt ggacgtgttc gccgccctcc cgtcgcccg cgcggttget 480
cgcccgggga cgtgttcgcc gccctcccgt cgcccgccgc ggttgetcgc cactcacatc 540
ccctactccc tcctgccgga gcgcatcacg tcggcgccgg cggacgacgg cgactccggt 600
tgccggatcg tgtacgtctg ccgggacccc aaggacgctg tcgtctccat gtggctgttc 660
accatgagca acatggtgaa ggtgtcaca acgaccacgg acgaacacca cccggcggcg 720
gcccggggcg cgccatcgat cgagcaggtg ttcgacctgt tctgcgacgg gcgagcatc 780
gctggggccgc agtggcacca cgtccgcgag tactgggagg agagccggag gcccgggag 840
aaggctctct tcctccggtg cgaggagatg ctgcgcgagc cggcgcgcaa cgtggagagg 900
ctcgccgagt tcctgcggtg cccgttcacc gccggcgagg tggcggccgg ggtggtggac 960
gccatcgctg acctatgcag catcgaccga ctcaggaacg tgcaggcga caagaccggg 1020
gtgaccgacc tggcgggtgaa gaaggagagc ttcttcggga gaggggtggc cggcgactgg 1080
agcaaccaca tgtcgccgga gatggcgtcg cggctggaca gggctcgtcga ggacgcgctg 1140
cgaggctccg ggttcacctt tgccgcgct gccggcgact cgaatga 1188

5 <210> 96
<211> 21
<212> ARN
<213> *Oryza sativa*

10 <400> 96
ggcccaugac uuugcaacca c 21

<210> 97
<211> 1197
<212> ADN
<213> *Oryza sativa*

15 <400> 97

ES 2 655 700 T3

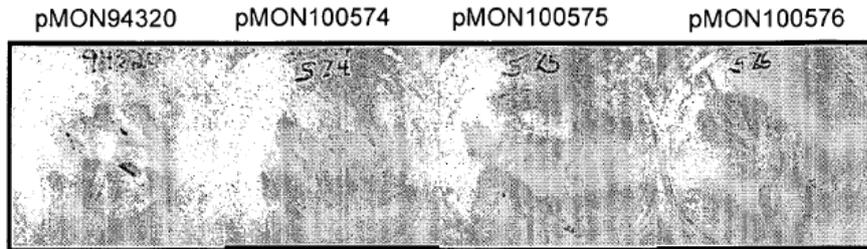
atggccgcgg cegtgtcct cctccgcgc ctgcgcggcg tcacggcggc gccccggcgc 60
 gggcgggcgg cgctgcccc gaccacgagc gtccgggggtg tctccgattc gacggagccg 120
 ctcaccatcg agacctcggc cccctacaag tcccacatcg tggaccgcgc cccgcgcgag 180
 gtggccacca cggcgcgcga gctcgcacc ttcttccgcg acatgtccgc catgcgcgcg 240
 gcggagatcg cggcggactc gctgtacaag gcgaagctga tccgcggctt ctgccacctc 300
 tacgacggac aggaggccgt cgcggtgggc atggaggcgg ccaccacccg cgcgcgcgc 360
 atcatcacgg cctaccgcga ccaactgcgc tacctcgccc gggcggcga cctcgcgcgc 420
 ctcttcgccc agctcatggg ccgcgcggc ggggtgctcca gggggaaagg cgggtcgatg 480
 cacctgtaca agaaggacgc caacttctat ggcggccatg gcacgtggg cgcgcaggtg 540
 ccgctcggat gcggcctcgc gttcgcgcag aggtacagga aggaggccgc cgtcacgttc 600
 gacctctacg gcgacggcgc cgccaaccag gggcagctgt tcgaggcgcct caacatggcg 660

gcgctctgga agctgcccgt cgtgctcgtc tgcgagaaca accactatgg gatggggacg 720
 gcggaatgga gggcatcgaa aagccccgca tactacaaac gggcgcgacta tgtgccagga 780
 ttgaaggtcg atggtatgga tgttcttgca gtcaacaag cttgtaaatt tgccaagcaa 840
 catgctcttg aaaatggacc gattattctt gagatggaca cctacagata ccacggacac 900
 tctatgtcag atccaggag cacttaccgc accagagatg aaattgcagg cataagacag 960
 gagcgcgatc caattgaaag ggtaggaag ctactactgg cccatgactt tgcaaccaca 1020
 caagaactca aggacatgga gaaagaaata aggaagcaag tcgacactgc catcgcgaaa 1080
 gcaaaggaaa gtccaatgcc cgatccatct gagctcttta caaatgtata tgttaatgac 1140
 tgcggtttgg agtcatttgg tgtggacagg aagggtggtg gaactgtact tccctag 1197

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ADN recombinante para la supresión génica que comprende un promotor funcional en células vegetales, operativamente unido a ADN recombinante que codifica un transcrito precursor de ARN pequeño en fase sintético y que comprende una secuencia de nucleótidos de una secuencia molde de ARN pequeño en fase, en la que dicho promotor es heterólogo de dicho ADN recombinante y en la que dicha secuencia de molde de ARN pequeño en fase comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de la SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 33, SEQ ID NO. 69, y la secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO. 34, en la que dicho transcrito precursor de ARN pequeño en fase sintético preserva la estructura secundaria del transcrito de dicha secuencia molde de ARN pequeño en fase, en la que dicha estructura secundaria comprende ARN hibridado que forma una estructura plegada que incluye dos brazos antiparalelos de cadena sencilla, en la que un brazo es sustancial, pero no perfectamente, complementario con el otro brazo, en la que el emparejamiento de bases entre los dos brazos de la estructura replegada da como resultado un ARN de doble cadena sustancialmente pero no perfectamente que incluye apareamientos erróneos, en el que dicho ARN hibridado comprende al menos tres ARN bicatenarios pequeños en fase contiguos, en la que cada ARN bicatenario pequeño en fase comprende dos segmentos de ARN antiparalelo de aproximadamente 20 a aproximadamente 27 nucleótidos, cada uno con al menos un apareamiento erróneo entre dichos segmentos por lo que dichos apareamientos erróneos se distribuyen a lo largo de dicho ARN hibridado, y en la que en dicho transcrito de precursor de ARN pequeño en fase sintético, al menos uno de los segmentos de ARN se modifica para suprimir al menos un gen diana reemplazando los nucleótidos de un segmento de ARN de al menos uno de dichos ARN de doble cadena pequeños en fase en dicha secuencia de molde de ARN pequeño en fase por nucleótidos correspondientes a dicho al menos un gen diana, en la que dicho al menos un gen diana se selecciona de entre múltiples segmentos no consecutivos de un gen diana, múltiples alelos de un gen diana o múltiples genes diana de una o más especies, en la que al menos una de dichas dos cadenas antiparalelas de dicho ARN bicatenario pequeño en fase es aproximadamente un 95 % complementaria de dicho al menos un gen diana, y en la que dicho promotor es heterólogo de dicho ADN recombinante.
2. La construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que dicho ARN hibridado se produce independientemente de una ARN polimerasa dependiente de ARN.
3. La construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que dicho ARN hibridado es escindible en fase *in vivo* mediante DCL4 o un ortólogo de DCL4 en dichos al menos tres ARN bicatenarios pequeños en fase contiguos.
4. La construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que dichos al menos tres ARN bicatenarios pequeños en fase contiguos suprimen múltiples genes diana.
5. Una célula vegetal transgénica que tiene en su genoma la construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1.
6. Una célula vegetal transgénica que tiene en su genoma la construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1, en la que
- (i) dichos ARN bicatenarios pequeños en fase inhiben una función biológica esencial en una plaga diana y dicha célula vegetal transgénica produce adicionalmente una o más proteínas insecticidas Bt que son tóxicas para dicha plaga diana; o
- (ii) dichos ARN bicatenarios pequeños en fase silencian un gen de patógeno vírico y dicha célula vegetal transgénica expresa además transgénicamente la proteína de la cubierta de dicho patógeno viral.
7. Una planta transgénica que comprende la célula vegetal transgénica no natural de la reivindicación 5 o 6.
8. Un procedimiento para suprimir al menos un gen diana en una planta o de una plaga o patógeno de dicha planta que comprende (a) transcribir la construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1 en dicha célula vegetal, o (b) proporcionar ARN bicatenarios pequeños en fase producidos a partir de dicha construcción de ADN recombinante de la reivindicación 1 a dicha planta.

FIGURA 3



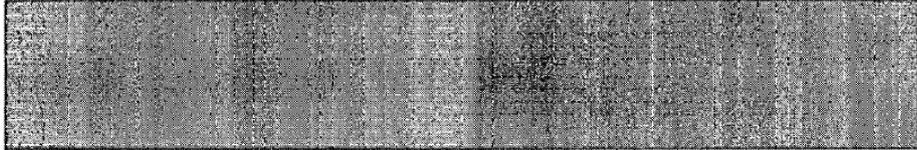
A

- B** pMON94320(control GUS)
 ATCGTCGGCTACAGCCTCGGGAATT CTCTGCATGCGTTTGGACGTATGCTCATTCAG
- C** pMON100574(sense ID1379342)
 CTACAGCCTCGGGAATT CTGCCCCACCAAGAGAACGCGTCTGCATGCGTTT
- D** pMON100575 (antisense ID1379342)
 CTACAGCCTCGGGAATT CCGGCGTTCTCTTGGTGGGGCATCTGCATGCGTTT
- E** pMON100576 (antisense ID1379342+ ID1275002)
 CTACAGCCTCGGGAATT CTGCTGATGTTGTTGGTGGCCACGGCGTTCTCTTGGTGGGGCATCTGCATGCGTTT

FIGURA 4

Endospermo de maíz en desarrollo (DAP)
10 DAP son el grano entero

10 21 27 33 NA 10 15 21 27 33 39



Embrión de maíz en desarrollo (DAP)

21 27 33 44 21 27 33 39 44

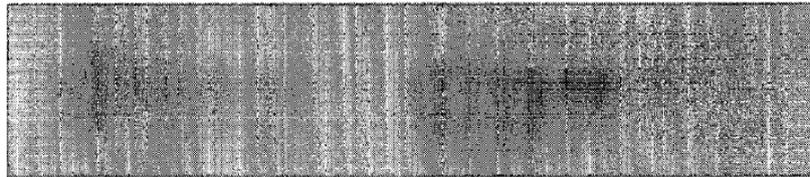


FIGURA 5

Transcrito de ARN pequeño
en fase endógeno
(SEQ ID NO. 17)

Transcrito de supresión
LKR/céreo modificado
(SEQ ID NO. 32)

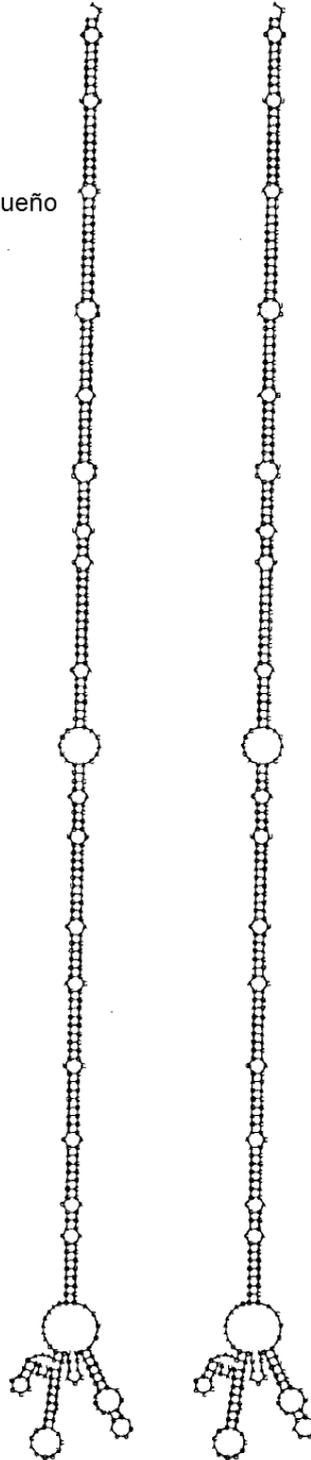


FIGURA 6

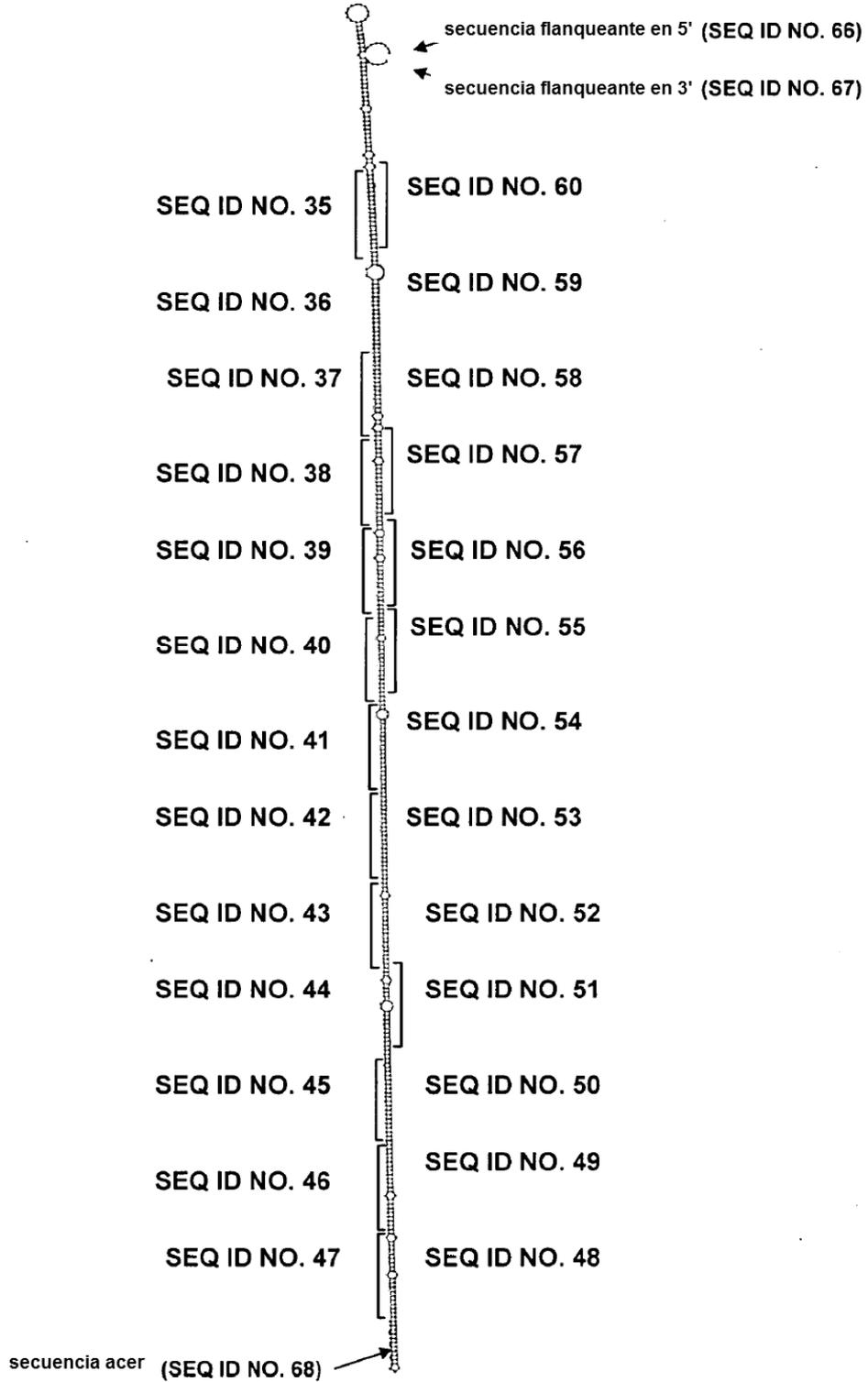
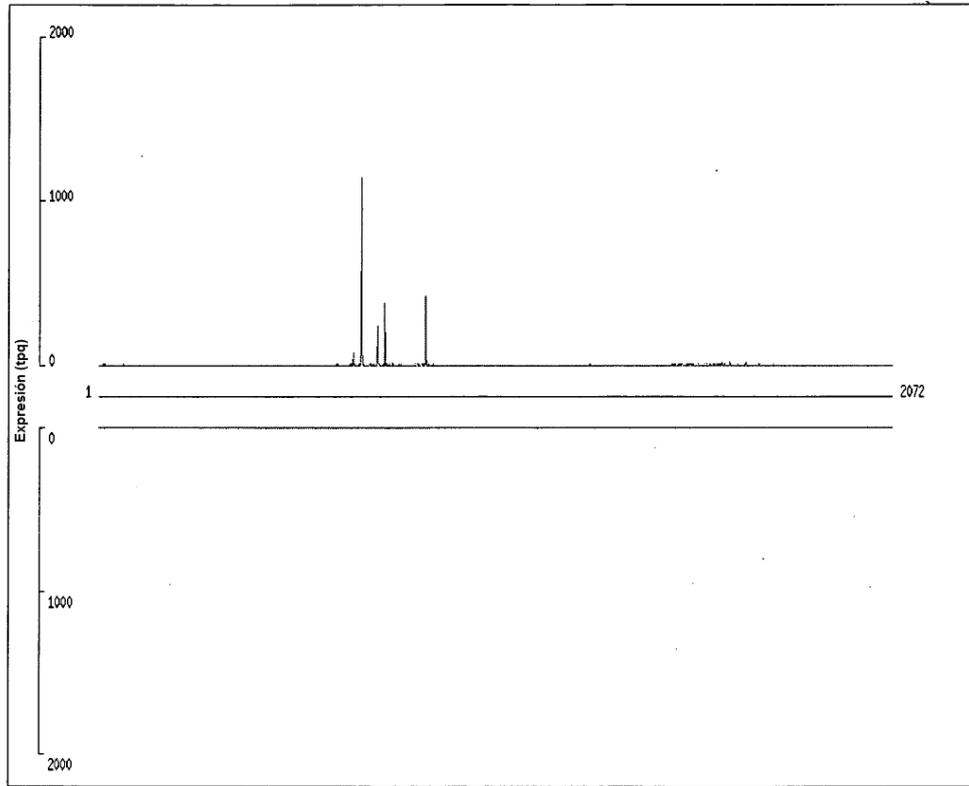
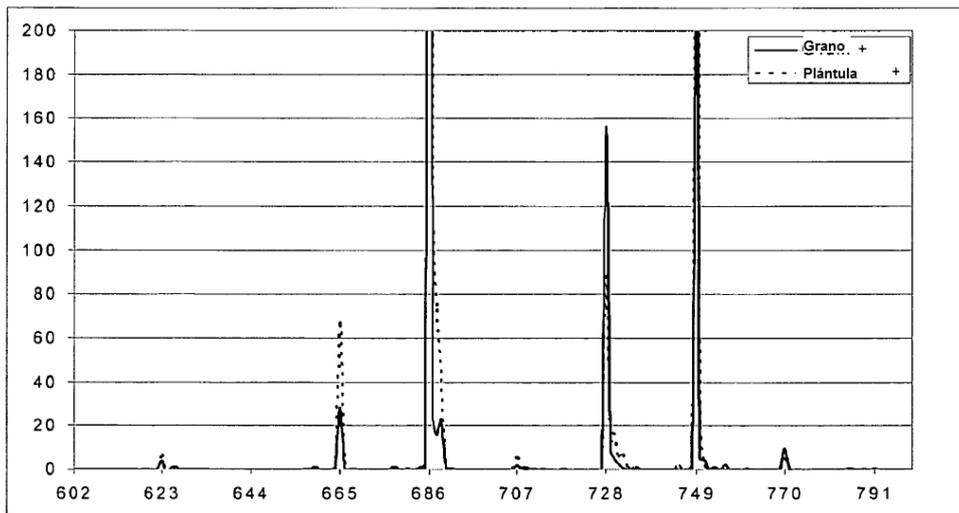


FIGURA 7



A



B

FIGURA 8

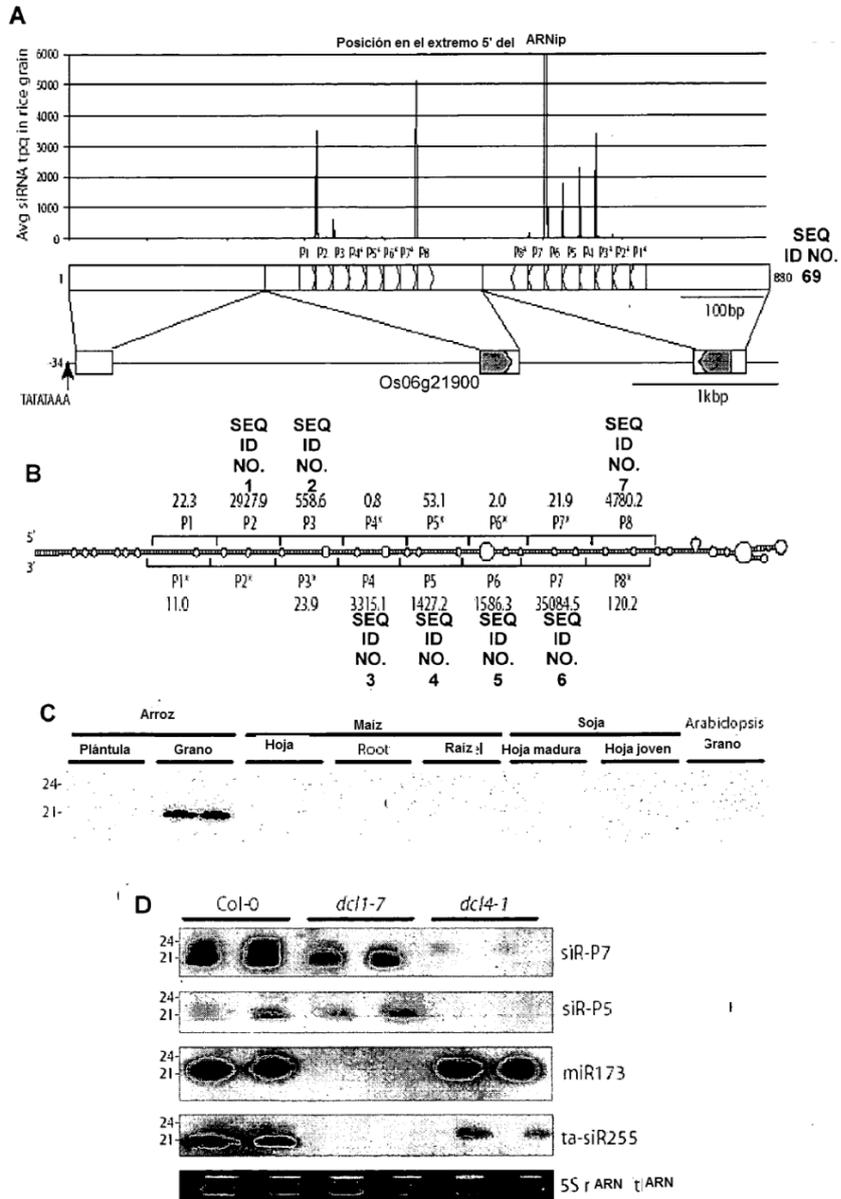


FIGURA 9

