

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 240**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/40 (2006.01)
C12N 15/64 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
C12N 15/80 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A01H 5/00 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/AU2012/001594**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13096992**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12863467 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2798065**

54 Título: **Silenciamiento génico y supresión del silenciamiento génico simultáneos en la misma célula**

30 Prioridad:

27.12.2011 US 201161580574 P

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

24.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WOOD, CRAIG CHRISTOPHER;
 NAIM, FATIMA;
 SINGH, SURINDER PAL y
 WATERHOUSE, PETER MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
 INVENCIONES, SLP**

ES 2 744 240 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Silenciamiento génico y supresión del silenciamiento génico simultáneos en la misma célula

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a células genéticamente modificadas que son capaces de una expresión transgénica óptima coexpresando un supresor de silenciamiento, mientras que al mismo tiempo también son capaces de silenciar un gen, tal como un gen natural de la célula. La presente invención también se refiere a métodos para producir las células modificadas, así como a procesos para obtener una célula genéticamente modificada con una propiedad deseada.

Antecedentes de la invención

La ingeniería de las células para expresar productos nuevos y valiosos es un tema central en biotecnología. Dicha ingeniería metabólica plantea una serie de demandas competitivas en la plataforma de expresión del hospedador, que incluye i) la necesidad de una expresión transgénica alta y sostenida, ii) el ensamblaje de rutas multigénicas complicadas, iii) la escalabilidad que permite ensayos de alto rendimiento o ciclos de producción más grandes, y iv) un expresoma del hospedador de ablación fácil que permite tanto el reemplazo de genes como conjuntos de sustratos optimizados para los flujos metabólicos manipulados nuevos. Los ensayos de expresión transitoria en hojas se han convertido en una plataforma de expresión versátil para la ingeniería metabólica al cumplir con los primeros tres criterios, concretamente, períodos altos y prolongados de expresión transgénica (Voinnet et al., 2003), ingeniería multigénica y optimización de rasgos de alto rendimiento (Wood et al., 2009; Petrie et al., 2010), y escalado para series de producción más grandes según se requiera para medicamentos personalizados (Bakker et al., 2006).

La sobreexpresión sostenida de transgenes en los ensayos de hojas depende de las proteínas supresoras virales (VSP), también conocidas como supresores silenciadores, para bloquear el aparato silenciador de la célula huésped. La VSP más utilizada es p19 que une específicamente un ARN pequeño de 21 nucleótidos con dos nucleótidos en 3' protuberantes (Ye et al., 2003) que son generados por la célula de la planta en respuesta al transgen extraño o ARNi en horquilla. Se ha descrito que p19 aumenta la expresión génica en ensayos de hojas a través de su actividad supresora. Esta VSP también inhibe la efectividad del ARNi, haciéndolo, supuestamente, incompatible con el silenciamiento génico simultáneo en la misma célula (Voinnet et al., 2003; Johansen and Carrington, 2001). La publicación de patente internacional WO2004/009779 describe la expresión del supresor viral HC-Pro que supuestamente es capaz de aumentar la acumulación de microARN (miARN) exógenos en una célula, mientras que al mismo tiempo se regula negativamente la ruta del ARNip.

Existe la necesidad de métodos que permitan la sobreexpresión concurrente de un transgen y la expresión reducida de otro gen, tal como un gen endógeno.

40 Sumario de la invención

Los presentes inventores han determinado que los polipéptidos supresores del silenciamiento se pueden coexpresar con un ARN de doble cadena (ARNdc) tal como un ARN en horquilla o un precursor de microARN y al menos se puede silenciar parcialmente un gen diana.

Por tanto, en un primer aspecto la presente invención proporciona una célula eucariota, preferentemente una célula vegetal, que comprende,

- i) un primer polinucleótido de interés que codifica un ARN diana,
- ii) un primer polinucleótido exógeno que codifica una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc) que comprende una primera secuencia de nucleótidos que es complementaria con una región del ARN diana codificada por el primer polinucleótido de interés,
- iii) un segundo polinucleótido exógeno que codifica un polipéptido supresor del silenciamiento,
- iv) un tercer polinucleótido exógeno, diferente del primer y segundo polinucleótidos exógenos y del primer polinucleótido de interés, que codifica un ARN de interés,
- v) un nivel reducido del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o una cantidad reducida de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno, y
- vi) un nivel aumentado del ARN de interés y/o la cantidad de proteína codificada por el ARN de interés cuando se compara con una célula correspondiente que tiene el tercer polinucleótido exógeno y que carece del segundo polinucleótido exógeno, en el que cada polinucleótido exógeno está unido operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión del polinucleótido en la célula, y en el que la célula comprende el polipéptido supresor del silenciamiento y la molécula de ARNdc o un producto de ARN procesado del mismo que comprende la primera secuencia de nucleótidos y es capaz de reducir en la célula el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno, y en el que el supresor del

silenciamiento se une preferentemente a una molécula de ARN de doble cadena que tiene extremos 5' protuberantes en relación con una molécula de ARN de doble cadena correspondiente que tiene extremos romos.

5 Tal como apreciaría el experto en la materia, el polipéptido supresor del silenciamiento será compatible con la molécula de ARNdc, de modo que ambos puedan ejercer sus efectos en la misma célula durante al menos parte del mismo tiempo. Por tanto, en la invención, el supresor del silenciamiento ejerce su efecto supresor mediante un mecanismo que permite que el ARN bicatenario o el producto de ARN procesado del mismo reduzca la expresión del ARN diana y/o reduzca la producción de una proteína codificada por el ARN diana.

10 El primer polinucleótido de interés puede no estar presente en la célula todo el tiempo, por ejemplo, si el primer polinucleótido de interés es un gen de un patógeno de la célula tal como un patógeno viral. En dichos casos, la molécula de ARNdc se puede producir en la célula antes de, o para proteger la célula contra, la presencia del primer polinucleótido de interés.

15 En una realización, el primer polinucleótido de interés es un gen endógeno de la célula o un transgen y/o un gen de un patógeno, tal como un virus, de la célula.

20 Se pretende que el tercer polinucleótido exógeno se exprese a un nivel aumentado en la célula por la presencia del supresor del silenciamiento. La célula puede comprender un cuarto, quinto o más polinucleótidos exógenos que se expresan de manera similar a un nivel aumentado por la presencia del supresor del silenciamiento.

En una realización, el primer y segundo polinucleótidos exógenos forman parte de la misma construcción de ADN, que preferentemente está integrada en el genoma de la célula.

25 En una realización adicional, el primero, segundo y tercer polinucleótidos exógenos forman parte de la misma construcción de ADN, que preferentemente está integrada en el genoma de la célula.

Preferentemente, al menos el segundo polinucleótido exógeno está integrado en el genoma de la célula.

30 En una realización, la célula, preferentemente una célula vegetal, comprende al menos un 25 %, preferentemente al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % de reducción en el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno. En otra realización, la célula, preferentemente una célula vegetal, comprende de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 75 % a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 90 %, o de aproximadamente el 75 % a aproximadamente el 90 % de reducción en el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno. La medida en que se reduce el ARN diana puede modularse a un nivel deseado por la estructura o nivel de la molécula de ARNdc, según se desee.

45 De acuerdo con la invención, el supresor del silenciamiento se une preferentemente a una molécula de ARN de doble cadena que tiene extremos 5' protuberantes en relación con una molécula de ARN de doble cadena correspondiente que tiene extremos romos. Esta es una característica del supresor del silenciamiento tipo V2, es decir, para V2 y sus ortólogos funcionales. En una realización adicional, el supresor del silenciamiento comprende aminoácidos que tienen una secuencia como se proporciona en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 o 38 a 51, un fragmento biológicamente activo del mismo, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 30 % idéntica a una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1, o 38 a 51.

50 En otro aspecto de la presente memoria descriptiva, el supresor del silenciamiento se une preferentemente a una molécula de ARNdc que tiene 21 pares de bases de longitud con respecto a una molécula de ARNdc de una longitud diferente. Esta es una característica de al menos el supresor del silenciamiento tipo p19, es decir, para p19 y sus ortólogos funcionales. Aún en otra realización, el supresor del silenciamiento comprende aminoácidos que tienen una secuencia como se proporciona en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, o 27 a 37, un fragmento biológicamente activo del mismo, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 30 % idéntica a una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 2, o 27 a 37.

60 En una realización, la molécula de ARNdc o un producto de ARN procesado de la misma, comprende al menos 19 nucleótidos consecutivos, preferentemente cuya longitud es de 19-24 nucleótidos con 19-24 pares de bases consecutivos en el caso de una molécula de ARN en horquilla de doble cadena o producto de ARN procesado, más preferentemente que consiste en 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos de longitud, y que comprende preferentemente un nucleótido metilado, que es al menos 95 % idéntico al complemento de la región del ARN diana, y en el que la región del ARN diana está i) dentro de una región no traducida 5' del ARN diana, ii) dentro de la mitad 5' del ARN diana, iii) dentro de un marco de lectura abierto que codifica proteínas del ARN diana, iv) dentro de la mitad 3' del ARN diana, o v) dentro de una región 3' no traducida del ARN diana.

5 En una realización, la molécula de ARNdc es un precursor de microARN (miARN) y/o en el que el producto de ARN procesado del mismo es un miARN. La secuencias de hibridación en un precursor de miARN no tienen todas las bases emparejadas, teniendo más de un nucleótido sin bases emparejadas en cada una de las secuencias de hibridación, que forman protuberancias en la estructura de ARNdc hibridado. El emparejamiento de bases puede incluir uno o más pares de bases G:U.

En una realización, el tercer polinucleótido exógeno codifica una proteína o precursor de microARN.

10 En una realización adicional, la célula, preferentemente una célula vegetal, comprende adicionalmente al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco, polinucleótidos exógenos diferentes adicionales, cada uno de los cuales codifica diferentes ARN de interés, preferentemente donde los polinucleótidos adicionales forman parte de la misma construcción de ADN.

15 En una realización, la célula, preferentemente una célula vegetal, comprende adicionalmente al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco, polinucleótidos exógenos diferentes, cada uno de los cuales codifica diferentes moléculas de ARNdc que comprenden diferentes secuencias de nucleótidos que son complementarias con una región de diferentes ARN diana codificados por diferentes polinucleótidos de interés y/o diferentes secuencias de nucleótidos que son complementarias con diferentes regiones del mismo ARN diana, preferentemente donde los polinucleótidos adicionales forman parte de la misma construcción de ADN.

20 En una realización, el primer polinucleótido exógeno codifica más de un miARN, preferentemente al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco miARN, cada uno de los cuales comprende independientemente diferentes secuencias de nucleótidos que son complementarias con una región de diferentes ARN diana codificadas por diferentes polinucleótidos de interés y/o diferentes secuencias de nucleótidos que son complementarias con diferentes regiones del mismo ARN diana. Los múltiples miARN se transcriben preferentemente desde el primer polinucleótido exógeno como un único transcrito precursor de miARN que posteriormente es procesado en los diferentes miARN por la maquinaria celular como una Dicer.

30 Ejemplos de una célula eucariota de la invención incluyen, pero sin limitación, una célula vegetal, una célula fúngica tal como una célula de levadura, una célula de un animal invertebrado o una célula de un animal vertebrado. La célula de un animal vertebrado puede ser una célula de un mamífero tal como una célula humana o una célula de un mamífero no humano. La célula puede ser *in vitro* tal como en un cultivo celular o *ex vivo* o *in vivo*. La célula puede estar comprendida en un tejido, órgano u organismo.

35 En una realización, cuando la célula es una célula vegetal, preferentemente es una célula de una planta o es una parte de la planta tal como una semilla, hoja o tallo. La célula puede ser de una planta angiosperma, una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea.

40 En una realización, uno o más o todos los polinucleótidos exógenos no están integrados en el genoma de la célula, es decir, están separados del genoma. En esta realización, los polinucleótidos exógenos pueden expresarse transitoriamente. Los polinucleótidos exógenos pueden carecer de estructuras o secuencias necesarias para la integración o la replicación en la célula.

45 En una realización, los polinucleótidos exógenos están unidos operativamente a diferentes promotores. En una realización alternativa, los polinucleótidos exógenos están cada uno unidos operativamente al mismo promotor, es decir, se usa la misma secuencia promotora para expresar cada polinucleótido exógeno. Aún en otra realización, la célula comprende al menos tres polinucleótidos exógenos donde al menos dos de los promotores son iguales y al menos uno es diferente.

50 En una realización particularmente preferida, cuando se integra de forma estable en el genoma, el promotor unido operativamente al segundo polinucleótido exógeno que codifica un polipéptido supresor del silenciamiento no es un promotor constitutivo. Por ejemplo, se prefiere que el promotor sea un promotor específico de tejido y/o específico de etapa tal como un promotor específico de semilla, un promotor específico de endospermo o un promotor específico de embrión de planta, o como alternativa un promotor inducible. En esta realización, el promotor se expresa preferentemente en el tejido u órgano deseado en relación con otros tejidos u órganos del organismo.

55 Las células de la invención pueden usarse para modificar una amplia gama de fenotipos de la célula. Por ejemplo, en las que la expresión del primer y segundo polinucleótidos exógenos da como resultado la modificación de la síntesis de ácidos grasos o carbohidratos tal como la síntesis de almidón en la célula, o de otro metabolito en la célula. Como otro ejemplo, la expresión del primer, segundo y tercer polinucleótidos exógenos da como resultado la modificación de la síntesis de ácidos grasos o carbohidratos, como la síntesis de almidón en la célula. En otro ejemplo, el tercer polinucleótido exógeno codifica un anticuerpo o un antígeno, preferentemente donde la expresión de la molécula de ARNdc da como resultado una reducción en el nivel y/o modifica la composición de los carbohidratos unidos al anticuerpo o antígeno. Esto puede lograrse mediante la molécula de ARNdc reduciendo la expresión de genes en la célula que codifican las glucosil, fucosil o xilosil transferasas que modifican la composición de los carbohidratos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una planta o una parte de una planta que comprende,

- 5 i) un primer polinucleótido de interés que codifica un ARN diana,
- ii) un primer polinucleótido exógeno que codifica una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc) que comprende una primera secuencia de nucleótidos que es complementaria con una región de un ARN diana codificada por el primer polinucleótido de interés,
- 10 iii) un segundo polinucleótido exógeno que codifica un polipéptido supresor del silenciamiento,
- iv) un tercer polinucleótido exógeno, diferente del primer y segundo polinucleótidos exógenos y del primer polinucleótido de interés, que codifica un ARN de interés,
- 15 v) un nivel reducido del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o una cantidad reducida de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una planta o parte de la planta correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno, y
- vi) un nivel aumentado del ARN de interés y/o la cantidad de proteína codificada por el ARN de interés cuando se compara con una planta o parte de la planta correspondiente que tiene el tercer polinucleótido exógeno y que carece del segundo polinucleótido exógeno,

20 en el que cada polinucleótido exógeno está unido operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión del polinucleótido en una célula vegetal, y en el que la planta o parte de la planta comprende el polipéptido supresor del silenciamiento y la molécula de ARNdc o un producto de ARN procesado del mismo que comprende la primera secuencia de nucleótidos y es capaz de reducir en la célula el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno, y en el que el supresor del silenciamiento se une preferentemente a una molécula de ARN de doble cadena que tiene extremos 5' protuberantes en relación con una molécula de ARN de doble cadena correspondiente que tiene extremos romos. La planta puede ser una angiosperma, una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea, o una parte de la misma. La parte de la planta, preferentemente una semilla, puede modificarse para que no pueda germinar o dar lugar a la progenie de la planta. Por ejemplo, la parte de la planta puede procesarse mediante pulido, molienda, triturado o similares.

30 En una realización, la planta o parte de planta se caracteriza además por una o más de las características anteriores.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un proceso para producir una célula eucariota, preferentemente una célula vegetal, de la invención, comprendiendo el método

- 35 a) introducir en una célula eucariota uno o más de
 - i) un primer polinucleótido exógeno que codifica una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc) que comprende una primera secuencia de nucleótidos que es complementaria con una región de un ARN diana codificada por un primer polinucleótido de interés en la célula eucariota,
 - 40 ii) un segundo polinucleótido exógeno que codifica un polipéptido supresor del silenciamiento,
 - iii) un tercer polinucleótido exógeno, diferente del primer y segundo polinucleótidos exógenos y del primer polinucleótido de interés, que codifica un ARN de interés,

de tal modo que la célula comprende el primer, segundo y tercer polinucleótidos exógenos, y

- 45 b) expresar el primero, segundo y tercer polinucleótidos exógenos en la célula, en el que la célula comprende
 - iv) un nivel reducido del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o una cantidad reducida de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno, y
 - 50 un nivel aumentado del ARN de interés y/o la cantidad de proteína codificada por el ARN de interés cuando se compara con una célula correspondiente que tiene el tercer polinucleótido exógeno y que carece del segundo polinucleótido exógeno, y en el que cada polinucleótido exógeno está unido operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión del polinucleótido en la célula, y en el que la célula comprende el polipéptido supresor del silenciamiento y la molécula de ARNdc o un producto de ARN procesado del mismo que comprende la primera secuencia de nucleótidos y es capaz de reducir en la célula el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno, y en el que el supresor del silenciamiento se une preferentemente a una molécula de ARN de doble cadena que tiene extremos 5' protuberantes en relación con una molécula de ARN de doble cadena correspondiente que tiene extremos romos.
 - 55
 - 60

La célula en la que se introducen uno o más de los polinucleótidos exógenos puede comprender ya un polinucleótido exógeno distinto del uno o más polinucleótidos exógenos, o puede haber sido no transgénica antes de la introducción. Este proceso puede usarse como un ensayo de detección para determinar si uno o más de los polinucleótidos exógenos tienen una función deseada, o si la combinación de polinucleótidos exógenos juntos produce un fenotipo deseado.

En una realización, la célula comprende al menos el primero, segundo y tercer polinucleótidos exógenos, y el proceso comprende además una o más etapas seleccionadas de:

- 5 c) analizar la célula para detectar la presencia de uno o más del primer, segundo y tercer polinucleótidos exógenos, el primer polinucleótido de interés o el ARN de interés, y
- d) analizar la célula para detectar una reducción en el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de la proteína codificada por el ARN diana,
- 10 e) analizar la célula para determinar el nivel de ARN de interés y/o la cantidad de proteína codificada por el ARN de interés, si está presente, y
- f) seleccionar una célula que tiene un mayor nivel de ARN de interés y/o una mayor cantidad de proteína codificada por el ARN de interés cuando se compara con una célula correspondiente que tiene el tercer polinucleótido exógeno y que carece del segundo polinucleótido exógeno, y/o que tiene un nivel reducido del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o una cantidad reducida de la proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno.

En una realización, la etapa a) comprende introducir en la célula dos o tres polinucleótidos exógenos.

En una realización, la célula seleccionada se caracteriza además por una o más de las características anteriores.

- 20 En una realización, la célula es una célula vegetal y el proceso comprende además la etapa de regenerar una planta transformada a partir de una célula que comprende los polinucleótidos exógenos. El proceso puede comprender además cosechar una parte de la planta, preferentemente una o más semillas, hojas, tallos o tubérculos, de la planta transformada, y/u obtener plantas de progenie de la planta transformada. Las etapas de análisis descritas anteriormente pueden llevarse a cabo en la parte de la planta cosechada o en la planta de la progenie.

En una realización, el o los polinucleótidos exógenos se expresan transitoriamente en la célula.

En una realización, la célula es una célula de hoja de una planta o una célula de una semilla.

- 30 También se describe un proceso para seleccionar una célula eucariota, preferentemente una célula vegetal, con una propiedad deseada que resulta de un mayor nivel de ARN de interés y/o cantidad de proteína codificada por el ARN de interés, y un nivel reducido de ARN diana codificado por un primer polinucleótido de interés y/o cantidad de la proteína codificada por el ARN diana, comprendiendo el proceso;

- 35 i) obtener una o más células de la invención que comprenden el tercer polinucleótido exógeno,
- ii) analizar la célula o células para determinar la propiedad deseada,
- iii) si la célula o células no tienen la propiedad deseada, sustituir uno o más de los polinucleótidos exógenos con un polinucleótido o polinucleótidos alternativos y analizar la célula o células resultantes para determinar la propiedad deseada,
- 40 iv) si es necesario, repetir la etapa iii) hasta obtener la propiedad deseada, y
- v) seleccionar una célula con la propiedad deseada.

- 45 La célula o células pueden estar comprendidas en un tejido, órgano u organismo, por ejemplo, en una planta transgénica, de modo que el análisis de la etapa ii) se realiza a nivel del tejido, órgano u organismo. La propiedad deseada puede ser cualquier fenotipo de la célula, tejido, órgano u organismo.

- 50 En un aspecto, el primer polinucleótido exógeno se sustituye de tal manera que una molécula de ARNdc codificada comprende más o menos de una secuencia de nucleótidos que está más cerca del extremo 3' del ARN diana en comparación con el polinucleótido exógeno utilizado en la etapa anterior.

- 55 En un aspecto, el segundo polinucleótido exógeno se sustituye con un polinucleótido exógeno diferente que codifica un supresor del silenciamiento diferente o un supresor del silenciamiento candidato. En esta realización, los supresores del silenciamiento candidatos pueden evaluarse en cuanto a su capacidad para suprimir el silenciamiento y, por lo tanto, aumentar la expresión del tercer polinucleótido exógeno, o pueden compararse con los supresores del silenciamiento candidatos.

- 60 En un aspecto adicional, la presente memoria descriptiva describe un proceso para seleccionar una célula eucariota, preferentemente una célula vegetal, con una propiedad deseada que resulta de un mayor nivel de ARN de interés y/o cantidad de proteína codificada por el ARN de interés, y un nivel reducido de ARN diana codificado por un primer polinucleótido de interés y/o cantidad de la proteína codificada por el ARN diana, comprendiendo el proceso;

- 65 i) obtener una población de células, preferentemente cada una en un tejido, órgano u organismo, tal como una planta transgénica, que comprende el tercer polinucleótido exógeno, y en el que al menos algunas de las células tienen diferentes combinaciones de diferentes primer, segundo o tercero polinucleótidos exógenos,
- ii) analizar la célula o células para determinar la propiedad deseada, y

iii) seleccionar una o más células con la propiedad deseada.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un proceso para seleccionar una célula eucariota, preferentemente una célula vegetal, con un nivel deseado de silenciamiento de un polinucleótido de interés, comprendiendo el proceso;

- i) obtener una o más células de acuerdo con la invención,
- ii) analizar la célula o células para determinar uno o más de (a) el nivel del ARN codificado por el polinucleótido de interés, (b) la cantidad de la proteína codificada por el ARN diana, (c) el nivel de la molécula de ARNdc o un producto de ARN procesado de la misma el cual comprende la primera secuencia de nucleótidos y que es capaz de reducir en la célula el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de una proteína codificada por el ARN diana en comparación con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno y (d) un fenotipo determinado por el polinucleótido de interés,
- iii) si la célula o células no tienen el nivel deseado de silenciamiento del polinucleótido de interés, sustituir uno o ambos polinucleótidos exógenos con un polinucleótido o polinucleótidos alternativos y analizar la célula o células resultantes para determinar el nivel deseado de silenciamiento,
- iv) si es necesario, repetir la etapa iii) hasta obtener el nivel deseado de silenciamiento del polinucleótido de interés, y
- v) seleccionar una célula con el nivel deseado de silenciamiento,

en el que cada polinucleótido exógeno está unido operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de los polinucleótidos en la célula. La una o más células pueden analizarse al mismo tiempo, en lotes o secuencialmente. El nivel deseado de silenciamiento del polinucleótido de interés puede evaluarse analizando la célula para determinar una propiedad deseada esperada como resultado del silenciamiento.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un proceso para seleccionar un supresor del silenciamiento que es compatible con una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc) de interés, que comprende las etapas de

- i) obtener una o más células eucariotas, preferentemente células vegetales, y preferentemente cada una en un tejido, órgano u organismo, tal como una planta transgénica, cada una de las cuales comprende (a) un primer polinucleótido exógeno que codifica la molécula de ARNdc que comprende una primera secuencia de nucleótidos que es complementaria con una región de un ARN diana codificado por un primer polinucleótido de interés, y (b) un segundo polinucleótido exógeno que codifica un polipéptido supresor del silenciamiento candidato que puede ser compatible con la molécula de ARNdc, en el que cada polinucleótido exógeno está unido operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión del polinucleótido en la célula,
- ii) analizar la célula o células para determinar uno o más de (a) el nivel del ARN codificado por el polinucleótido de interés, (b) la cantidad de la proteína codificada por el ARN diana, (c) el nivel de la molécula de ARNdc o un producto de ARN procesado de la misma el cual comprende la primera secuencia de nucleótidos y que es capaz de reducir en la célula el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de una proteína codificada por el ARN diana en comparación con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno y (d) un fenotipo determinado por el polinucleótido de interés,
- iii) si la célula o células no tienen una propiedad deseada, sustituir el segundo polinucleótido exógeno en la célula con un polinucleótido o polinucleótidos alternativos que codifica un supresor del silenciamiento compatible candidato y repetir la etapa ii), y
- iv) si es necesario, repetir la etapa (iii) hasta que se identifique una célula o células con la propiedad deseada, seleccionando así el supresor del silenciamiento que sea compatible con la molécula de ARNdc. De este modo, este proceso proporciona un ensayo de detección para determinar si el supresor del silenciamiento y la molécula de ARNdc pueden funcionar en la misma célula, es decir, son compatibles, y permite probar o comparar múltiples combinaciones de los mismos.

En un aspecto preferido, la célula o células comprenden además un tercer polinucleótido exógeno, diferente del primer y segundo polinucleótidos exógenos y del primer polinucleótido de interés, y el proceso comprende además la etapa de analizar la célula o células para determinar uno o más del nivel de expresión del tercer polinucleótido exógeno o un fenotipo de la célula o células determinado por el tercer polinucleótido exógeno.

En un aspecto más preferido, el nivel de expresión del tercer polinucleótido exógeno se incrementa en presencia del supresor del silenciamiento seleccionado en comparación con una célula correspondiente que tiene el tercer polinucleótido exógeno y que carece del segundo polinucleótido exógeno.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una construcción de ADN que comprende,

- i) un primer polinucleótido que codifica una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc) que comprende una primera secuencia de nucleótidos que es complementaria con una región de un ARN diana codificada por un primer polinucleótido de interés, y
- ii) un segundo polinucleótido que codifica un supresor del silenciamiento,

en el que cada polinucleótido está unido operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de los polinucleótidos en la célula, preferentemente una célula vegetal, y el primer y segundo polinucleótidos son exógenos a la célula, en el que la construcción de ADN comprende adicionalmente un tercer polinucleótido, diferente del primer o segundo polinucleótido o primer polinucleótido de interés, de modo que en una célula eucariota que comprende la construcción de ADN, la molécula de ARNdc o un producto de ARN procesado de la misma, que comprende la primera secuencia de nucleótidos es capaz de reducir el nivel del ARN diana codificado por el primer por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido, y la expresión del tercer polinucleótido en una célula eucariota que comprende la construcción de ADN aumenta cuando se compara con una célula correspondiente que tiene el tercer polinucleótido y que carece del segundo polinucleótido, y en el que el supresor del silenciamiento se une preferentemente a una molécula de ARN de doble cadena que tiene extremos 5' protuberantes en relación con una molécula de ARN de doble cadena correspondiente que tiene extremos romos.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe un vector que comprende la construcción de ADN de la invención.

En un aspecto adicional, la presente memoria descriptiva describe una célula que comprende la construcción de ADN de la invención y/o el vector de la invención.

También se describe una célula producida o seleccionada usando el proceso de la invención.

En otro aspecto, se describe un organismo eucariota no humano transgénico que comprende una célula de la invención.

En un aspecto, el organismo eucariota no humano transgénico es una planta.

En un aspecto adicional, la presente memoria descriptiva describe una parte de un organismo eucariota no humano transgénico de la invención que comprende una célula de la invención.

En un aspecto, la parte es una semilla, hoja, tallo, flor, raíz o tubérculo.

Las células, de la invención, u organismos transgénicos no humanos que comprenden la célula o una parte de la misma pueden usarse para una amplia variedad de propósitos dependiendo de las células, el ARNdc y el ARN de interés. Por tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para fabricar un producto, comprendiendo el método uno o más de obtener, hacer crecer, cultivar o poner en cultivo una célula de la invención, comprendiendo un organismo no humano transgénico la célula o una parte de la misma y procesar la célula, organismo o parte para producir el producto.

En una realización, el producto es uno o más de un alimento, un aceite, un ácido graso, un medicamento, combustible o un producto industrial. La invención proporciona además usos de los polinucleótidos o células de la invención para producir tales productos.

Cualquier realización de la presente memoria se considerará que se aplica *mutatis mutandis* a cualquier otra realización a menos que se indique específicamente lo contrario.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique específicamente lo contrario o el contexto requiera lo contrario, la referencia a una única etapa, composición de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia, deberá entenderse que abarca una o una pluralidad (es decir una o más) de estas etapas, composiciones de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia.

La invención se describe en lo sucesivo en el presente documento mediante los siguientes Ejemplos no limitantes y con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos adjuntos

Figura 1: V2 permite la sobreexpresión de los transgenes y su silenciamiento eficiente mediante un ARNi de horquilla. A, Evolución temporal de la expresión de GFP con VSP no co-infiltrada o la adición de V2 o p19. La imagen muestra una hoja representativa fotografiada hasta 7 días después de la infiltración (dpi), y la imagen a 7 dpi se utiliza para ilustrar el etiquetado de cada zona de infiltración. B, Evolución temporal del efecto de V2 o p19 sobre el silenciamiento basado en horquilla de GFP. La imagen muestra una hoja representativa fotografiada a 5 dpi.

Figura 2: Análisis de transferencia Western de la expresión de GFP en hojas recogidas a 4 dpi. La imagen muestra un experimento de un duplicado realizado en diferentes hojas.

Figura 3: Análisis de la composición de la fracción de fosfatidilcolina (PC) de las hojas infiltradas con varias

combinaciones de V2, p19 y hpNbFAD2. Las hojas se recogieron 5 dpi y las barras de error representan el error estándar de la media de 5 hojas independientes.

5 **Figura 4:** Análisis del contenido y composición de los aceites de la hoja cuando las hojas se infiltraron con combinaciones de V2, p19, hpNbFAD2, DGAT1 y oleosina. Las hojas se recogieron 5 dpi y las barras de error representan el error estándar de la media calculado de 5 hojas independientes.

Figura 5: La producción enzimática de DHS a partir de ácido oleico.

10 **Figura 6:** Comparación de la producción de DHS en ensayos de hojas usando EcCPFAS o GhCPFAS en ensayos de expresión transitoria en hojas. Las hojas fueron cosechadas a 4 dpi.

15 **Figura 7:** Sobreexpresión de transgenes y silenciamiento de un endogen para flujos mejorados de DHS en aceites de la hoja. Las hojas fueron cosechadas a 4 dpi. Estas comparaciones se realizaron en 4 hojas diferentes, y esta figura muestra los resultados de una hoja representativa.

20 **Figura 8:** Análisis de 'secuenciación profunda' del tamaño y distribución de pequeñas poblaciones de ARN generadas por una horquilla dirigida al endogen NbFAD2. El NbFAD2 de longitud completa se representa indicando la región utilizada para generar una horquilla de 660 pb, hpNbFAD2. A continuación se ilustra el tamaño y la distribución de las clases dominantes de ARN pequeños en la cadena directa (F) e inversa (R) del NbFAD2. Cada trazo está redimensionado para mostrar la distribución relativamente desigual de los ARN pequeños a través del objetivo.

25 **Figura 9:** Números absolutos de las clases de tamaño de ARN pequeño dominante generadas por hpNbFAD2. El porcentaje relativo de cada clase de tamaño se da en el texto.

Figura 10: DHS se acumula en los aceites de la hoja.

30 **Figura 11:** Perfil de ácido graso de las hojas que producen DHS en presencia o ausencia de la elongasa AtFAE1. Se realizaron experimentos de alargamiento en 3 hojas diferentes, y la figura muestra un perfil representativo de ácidos grasos de una sola hoja.

35 **Figura 12:** La identificación de eDHS usando varias técnicas de GC y MS. Los paneles superiores muestran los trazos de GC (FID) de extractos de lípidos de hojas infiltradas con la combinación de genes como se muestra. Los metabolitos comunes y nuevos se muestran como se indica. Los paneles inferiores muestran el rango de masas para los metabolitos resueltos por primera vez en GC, DHS y eDHS. En la parte superior de cada MS se muestra la estructura de DHS y eDHS.

LEYENDA DEL LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 SEQ ID NO: 1 - secuencia de aminoácidos de la proteína V2 del virus del rizado amarillo de la hoja de tomate
 SEQ ID NO: 2 - secuencia de aminoácidos de la proteína P19 del virus del enanismo arbustivo del tomate
 SEQ ID NO: 3 - secuencia de nucleótidos que codifica la proteína V2 del virus del rizado amarillo de la hoja de tomate
 45 SEQ ID NO: 4 - secuencia de nucleótidos que codifica la proteína P19 del virus del enanismo arbustivo del tomate
 SEQ ID NO: 5 - secuencia de aminoácidos de la proteína oleosina de *Sesamum indicum*
 SEQ ID NO: 6 - secuencia de nucleótidos que codifica la proteína oleosina de *Sesamum indicum*
 SEQ ID NO: 7 - secuencia de aminoácidos de la proteína AtFAE1 de *Arabidopsis thaliana*
 SEQ ID NO: 8 - secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AtFAE1 de *Arabidopsis thaliana* incluyendo la
 50 secuencia del intrón 5'
 SEQ ID NO: 9 - secuencia de aminoácidos de la proteína AtDGAT1 de *Arabidopsis thaliana*
 SEQ ID NO: 10 - secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AtDGATI de *Arabidopsis thaliana*
 SEQ ID NO: 11 - secuencia de aminoácidos de la proteína NbFAD2
 SEQ ID NO: 12 - secuencia de nucleótidos que codifica la horquilla de ARNdc dirigida a la FAD2 de *N. benthamiana*
 55 SEQ ID NO: 13 a 20 - cebadores de oligonucleótidos
 SEQ ID NO: 21 - secuencia de aminoácidos de CPFAS-1 (proteína truncada) de *Gossypium hirsutum*
 SEQ ID NO: 22 - secuencia de aminoácidos de CPFAS-1 de *Gossypium hirsutum*
 SEQ ID NO: 23 - secuencia de nucleótidos que codifica la CPFAS-1 truncada de *Gossypium hirsutum*
 SEQ ID NO: 24 - secuencia de aminoácidos de CPFAS de *Escherichia coli*
 60 SEQ ID NO: 26 - marco de lectura abierto de CPFAS de *E. Coli* para la expresión en plantas
 SEQ ID NO: 27 - supresor del silenciamiento similar a p19 del virus de la mancha en anillo del címbidio
 SEQ ID NO: 28 - supresor del silenciamiento similar a p19 del virus de la mancha necrótica del pelargonio
 SEQ ID NO: 29 - supresor del silenciamiento similar a p19 del tombusvirus del río Havel
 SEQ ID NO: 30 - supresor del silenciamiento similar a p19 del virus de la necrosis del pepino
 65 SEQ ID NO: 31 - supresor del silenciamiento similar a p19 del virus latente de las vides de Argelia
 SEQ ID NO: 32 - supresor del silenciamiento similar a p19 del virus latente de la pera

- SEQ ID NO: 33 - supresor del silenciamiento similar a p19 del virus de las manchas necróticas de *Lisianthus*
 SEQ ID NO: 34 - supresor del silenciamiento similar a p19 del virus del amarilleo necrótico de la lechuga
 SEQ ID NO: 35 - supresor del silenciamiento similar a p19 del virus del rizado moteado de la alcachofa
 SEQ ID NO: 36 - supresor del silenciamiento similar a p19 del virus de la mancha anular del clavel italiano
 5 SEQ ID NO: 37 - supresor del silenciamiento similar a p19 del virus del rayado necrótico del maíz
 SEQ ID NO: 38 - supresor del silenciamiento similar a V2 del virus del enanismo clorótico de la sandía
 SEQ ID NO: 39 - supresor del silenciamiento similar a V2 del virus del arrugamiento amarillo de la oca
 SEQ ID NO: 40 - supresor del silenciamiento similar a V2 del virus del rizado de la hoja de la oca
 SEQ ID NO: 41 - supresor del silenciamiento similar a V2 del togovirus del rizado de la hoja del tomate
 10 SEQ ID NO: 42 - supresor del silenciamiento similar a V2 del virus del rizado de la hoja de *Ageratum* de Camerún
 SEQ ID NO: 43 - supresor del silenciamiento similar a V2 del virus del mosaico de la yuca Malawi de África Oriental
 SEQ ID NO: 44 - supresor del silenciamiento similar a V2 del virus del mosaico de la yuca de Sudáfrica
 SEQ ID NO: 45 - supresor del silenciamiento similar a V2 del virus del rizado de la hoja del tomate de Madagascar
 SEQ ID NO: 46 - supresor del silenciamiento similar a V2 del virus del rizado de la hoja del tomate de Zimbabue
 15 SEQ ID NO: 47 - supresor del silenciamiento similar a V2 del begomovirus del tomate
 SEQ ID NO: 48 - supresor del silenciamiento similar a V2 del virus del rizado de la hoja del tomate de Namakely
 SEQ ID NO: 49 - supresor del silenciamiento similar a V2 del virus de las venas amarillas del pimiento
 SEQ ID NO: 50 - supresor del silenciamiento similar a V2 del virus del rizado de la hoja del tomate de Sudán
 SEQ ID NO: 51 - supresor del silenciamiento similar a V2 del virus del rizado de la hoja del tomate de Omán
 20 SEQ ID NO: 52 - secuencia de nucleótidos que codifica el miARN dirigido a la fitoeno desaturasa de *A. thaliana*
 SEQ ID NO: 53 - secuencia de nucleótidos que codifica el miARN dirigido a la FAD2 de *A. thaliana*

Descripción detallada

25 Técnicas y definiciones generales

Salvo que se defina específicamente de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento se deben interpretar como que tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto en la materia (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteínas, y bioquímica).

A menos que se indique lo contrario, la proteína recombinante, el cultivo celular y las técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos convencionales, bien conocidos por el experto en la materia. Tales técnicas se describen y se explican a través de las fuentes bibliográficas tales como, J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D. M. Glover y B.D. Hames (editores), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel et al. (editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad), Ed Harlow y David Lane (editores) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan et al. (editores) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley y Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad).

El término "y/o", por ejemplo, "X y/o Y" se deber interpretar bien como "X e Y" o "X o Y", y se debe considerar que proporcionan un soporte explícito para ambos significados o para cualquiera de los significados.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", a menos que se indique lo contrario, se refiere a +/- 20 %, más preferentemente +/- 10 %, más preferentemente +/- 5 %, más preferentemente +/- 2 %, más preferentemente +/- 1 %, del valor designado.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende", o "comprendiendo", se entenderá que implican la inclusión de un elemento indicado, un número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, un número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

El término "exógeno" en el contexto de un polinucleótido o polipéptido se refiere al polinucleótido o polipéptido cuando está presente en una célula que no comprende naturalmente el polinucleótido o polipéptido. En una realización, el polinucleótido o polipéptido exógeno es de un género diferente. En otra realización, el polinucleótido o polipéptido exógeno es de una especie diferente. En una realización, el polinucleótido o polipéptido exógeno se expresa en un organismo o célula hospedador y el polinucleótido o polipéptido exógeno es de una especie o género diferente.

El término "correspondiente" se refiere a una célula, u organismo eucariota no humano o parte del mismo que tiene la misma constitución genética o similar que una célula, u organismo eucariota no humano o parte del mismo de la invención pero que no ha sido modificado como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la célula u organismo eucariota no humano o parte del mismo carece del primer polinucleótido exógeno que codifica el ARNdc y/o que carece del segundo polinucleótido exógeno que codifica el polipéptido supresor del silenciamiento. Una célula

o un organismo eucariota no humano o parte del mismo correspondiente puede usarse como un control para comparar niveles/cantidad de, por ejemplo, ARN y/o proteína, o el alcance y la naturaleza de la modificación del rasgo, por ejemplo, la producción y/o contenido de lípido no polar o almidón, con una célula u organismo eucariota no humano o parte del mismo modificado como se describe en el presente documento. Una persona experta en la materia puede determinar fácilmente una célula, tejido, órgano u organismo "correspondiente" para dicha comparación.

Tal como se usa en el presente documento "comparado con", "respecto a" o variaciones de los mismos se refiere a, por ejemplo, los niveles/cantidad de ARN y/o proteína de la célula transgénica, u organismo eucariota no humano o parte del mismo, que expresan el uno o más polinucleótidos exógenos con una célula, u organismo eucariota no humano o parte del mismo que carece de uno o más polinucleótidos exógenos.

La expresión "organismo eucariota no humano transgénico" se refiere, por ejemplo, a una planta entera, algas, animal no humano o un organismo adecuado para la fermentación tal como una levadura u hongo, que comprende un polinucleótido exógeno (transgen). En una realización, el organismo transgénico no humano es un organismo fototrófico (por ejemplo, una planta o alga) capaz de obtener energía de la luz solar para sintetizar compuestos orgánicos para la nutrición.

Tal como se usa en el presente documento, una "propiedad deseada" se refiere a un fenotipo que no posee la célula pero que se desea. La propiedad puede ser un aumento o disminución (o abolición) del nivel de un fenotipo existente o un fenotipo que no posee la célula sin los polinucleótidos exógenos.

Supresores del silenciamiento

El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) es un mecanismo de defensa específico de una secuencia de nucleótidos que puede dirigirse tanto a los ARNm celulares como virales para la degradación. El PTGS se produce en células eucariotas, como plantas u hongos transformados de manera estable o transitoria con un polinucleótido o polinucleótidos recombinantes y da como resultado una acumulación reducida de moléculas de ARN con una secuencia similar al polinucleótido introducido. "Post-transcriptional" se refiere a un mecanismo para la reducción que funciona al menos parcialmente, pero no necesariamente de manera exclusiva, después de la producción de un transcrito de ARN inicial, por ejemplo, durante el procesamiento de la transcripción del ARN inicial, o concomitante con el corte y empalme o la exportación del ARN al citoplasma, o dentro del citoplasma por complejos asociados con proteínas Argonauta.

Los niveles de la molécula de ARN pueden aumentarse, y/o los niveles de la molécula de ARN pueden estabilizarse durante numerosas generaciones o en diferentes condiciones ambientales, limitando la expresión de un supresor del silenciamiento en un órgano de almacenamiento de una planta o parte de la misma. Tal como se usa en el presente documento, un "supresor del silenciamiento" es cualquier polipéptido que puede expresarse en una célula eucariota que aumenta el nivel de producto de expresión de un transgen diferente en la célula, particularmente, durante generaciones repetidas a partir de la célula inicialmente transformada.

En una realización, el supresor del silenciamiento es un supresor del silenciamiento viral o mutante del mismo. En la técnica se conocen numerosos supresores del silenciamiento viral e incluyen, pero sin limitación P19, V2 (Glick et al. 2008; Fukunaga and Doudna, 2009), P38, Pe-Po y RPV-P0. Ejemplos de supresores del silenciamiento viral apropiados incluyen los descritos en el documento WO 2010/057246.

Un supresor del silenciamiento puede expresarse de manera estable en un organismo eucariota no humano transgénico o parte del mismo de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "expresado de manera estable" o variaciones de la misma se refieren al nivel de la molécula de ARN que es esencialmente igual o mayor en las células, organismos o partes de la progenie durante generaciones repetidas, por ejemplo, al menos tres, al menos cinco, o al menos diez generaciones, en comparación con las células, organismos o partes correspondientes que carecen del polinucleótido exógeno que codifica el supresor del silenciamiento. Sin embargo, esta expresión o expresiones no excluye la posibilidad de que durante generaciones repetidas haya una cierta pérdida de niveles de la molécula de ARN en comparación con una generación anterior, por ejemplo, una pérdida de no menos del 10 % por generación.

El supresor se puede seleccionar de cualquier fuente, por ejemplo, vegetal, vírica, mamífero, etc. El supresor puede ser, por ejemplo:

- B2 del virus de Flock House,
- P14 del virus latente del poto,
- AC2 del virus latente del poto,
- AC4 del virus del mosaico de la yuca africana,
- C2 del mosaico de las venas amarillas de la oca,
- C4 del mosaico de las venas amarillas de la oca,
- βC1 del mosaico de las venas amarillas de la oca,
- p22 del virus de la clorosis del tomate,

- CP del virus de la clorosis del tomate,
 CPm del virus de la clorosis del tomate,
 AL2 del virus del mosaico dorado del tomate,
 5 βC1 del virus del rizado de la hoja del tomate de Java,
 V2 del virus del rizado amarillo de la hoja de tomate,
 C2 del virus del rizado amarillo de la hoja del tomate de China,
 Y10, aislado βC1, del virus del rizado amarillo de la hoja del tomate de China,
 aislado de V2 del virus del rizado amarillo de la hoja del tomate de Israel,
 10 AC2 del virus del mosaico amarillo de la judía Vigna,
 CP del virus de la mancha anular clorótica del hibisco,
 P38 del virus de la arruga del nabo,
 CP del virus de la arruga del nabo,
 P6 del virus del mosaico de la coliflor,
 15 p21 del virus amarillo de la remolacha,
 p20 del virus de la tristeza de los cítricos,
 p23 del virus de la tristeza de los cítricos,
 CP del virus de la tristeza de los cítricos,
 SCP del virus del mosaico del caupí,
 20 p22 del virus del enanismo clorótico de la batata,
 2b del virus del mosaico del pepino,
 HC-Pro del virus de la aspermia del tomate,
 L2 del virus de la parte superior rizada de la remolacha,
 19K del virus del mosaico del trigo transmitido por el suelo,
 25 Gammab del virus del mosaico estriado de la cebada,
 Gammab del virus semilatente de poa,
 P15 del pecluvirus del achaparrado del cacahuete,
 Pns10 del virus enano del arroz,
 P0 del virus del amarilleo de las cucurbitáceas transmitido por pulgones,
 30 P0 del virus del amarilleo de la remolacha occidental,
 P25 del virus X de la patata,
 P1b del virus de las venas amarillas del pepino,
 HC-Pro del virus de la viruela del ciruelo,
 HC-Pro del virus del mosaico de la caña de azúcar,
 35 HC-Pro de la cepa del virus Y de la patata,
 P1/HC-Pro del virus del grabado del tabaco,
 P1/HC-Pro del virus del mosaico del nabo,
 P1 del virus del moteado del pasto ovillo,
 P1 aislado noruego del virus del moteado del pasto ovillo,
 40 P1 del virus del moteado amarillo del arroz,
 P1 aislado nigeriano del virus del moteado amarillo del arroz,
 NS3 del virus de la hoja blanca del arroz,
 NS3 del virus del rayado del arroz,
 126K del virus del mosaico del tabaco que infecta a las crucíferas,
 45 p122 del virus del mosaico del tabaco que infecta a las crucíferas,
 p122 del virus del mosaico del tabaco,
 126 del virus del mosaico del tabaco,
 130K del virus del mosaico del tabaco,
 16K del virus del cascabel del tabaco,
 virus del enanismo arbustivo del tomate P19,
 50 NSs del virus del bronceado del tomate,
 P50 del virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano,
 p10 del virus de la vid A,
 homólogo de BYV p21 del virus asociado al enrollamiento de la vid 2,
- 55 así como variantes/mutantes de los mismos. La lista anterior proporciona el virus del que se puede obtener el supresor
 y la proteína (por ejemplo, B2, P14, etc.) o la designación de la región codificante para el supresor de cada virus en
 particular. Se pueden obtener otros supresores del silenciamiento candidatos examinando en las secuencias del
 genoma viral los polipéptidos codificados en la misma posición dentro del genoma viral, en relación con la estructura
 de un genoma viral relacionado que comprende un supresor del silenciamiento conocido, como apreciará una persona
 60 experta en la materia.

Los supresores de silenciamiento se pueden clasificar según su modo de acción. Se ha encontrado que los supresores
 como V2 que se unen preferentemente a una molécula de ARN de doble cadena que tiene extremos 5' protuberantes
 en relación con una molécula de ARN de doble cadena correspondiente que tiene extremos romos son particularmente
 65 útiles para mejorar la expresión transgénica cuando se usa en combinación con el silenciamiento génico, en particular
 con el uso de un polinucleótido exógeno que codifica una ARNdc. Otros supresores como p19 que se unen

preferentemente a una molécula de ARNdc que tiene una longitud de 21 pares de bases en relación con una molécula de ARNdc de una longitud diferente también pueden permitir la expresión transgénica en presencia de un polinucleótido exógeno que codifica un ARNdc, pero generalmente en un grado menor que, por ejemplo, V2. Esto permite la selección de una combinación óptima de ARNdc, supresor del silenciamiento y transgen sobreexpresado para un propósito particular. Dichas combinaciones óptimas se pueden identificar utilizando un método de la invención.

De acuerdo con la invención, el supresor del silenciamiento se une preferentemente a una molécula de ARN de doble cadena que tiene extremos 5' protuberantes en relación con una molécula de ARN de doble cadena correspondiente que tiene extremos romos. En este contexto, la molécula de ARN de doble cadena correspondiente tiene preferentemente la misma secuencia de nucleótidos que la molécula con los extremos 5' protuberantes, pero sin los extremos 5' protuberantes. Los ensayos de unión se realizan rutinariamente, por ejemplo en ensayos *in vitro*, mediante cualquier método conocido por un experto en la materia.

En una realización adicional, el supresor del silenciamiento comprende aminoácidos que tienen una secuencia como se proporciona en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 o 38 a 51, un fragmento biológicamente activo del mismo, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 30 % idéntica a una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1, o 38 a 51.

Se pueden usar múltiples copias de un supresor. Se pueden usar conjuntamente diferentes supresores (por ej., en tándem).

Esencialmente, cualquier molécula de ARN de interés que sea deseable expresar en una célula, organismo o parte puede coexpresarse con el supresor del silenciamiento. La molécula de ARN puede influir, por ejemplo, en un rasgo agronómico, resistencia a insectos, resistencia a enfermedades, resistencia a herbicidas, esterilidad, características del grano y similares. Los polipéptidos codificados pueden estar implicados en el metabolismo de lípidos, almidón, hidratos de carbono, nutrientes, etc., o puede ser responsable de la síntesis de proteínas, péptidos, lípidos, ceras, almidones, azúcares, hidratos de carbono, aromas, olores, toxinas, carotenoides, hormonas, polímeros, flavonoides, proteínas de almacenamiento, ácidos fenólicos, alcaloides, lignina, taninos, celulosas, glucoproteínas, glicolípidos, etc.

En un ejemplo particular, las plantas producen niveles aumentados de enzimas para la producción de lípidos en plantas como Brassica, por ejemplo, aceite de colza o de girasol, cártamo, lino, algodón, soja o maíz.

Silenciamiento

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc) que comprende una primera secuencia de nucleótidos que es complementaria con una región de un ARN diana codificado por un primer polinucleótido de interés" o variaciones de la misma se refiere a una molécula de ARN que se puede utilizar para regular a la baja los niveles de un ARN diana, y/o la cantidad de proteína codificada por el ARN diana, en una célula, que comprende una región de ARN de doble cadena que comprende la primera secuencia de nucleótidos ("secuencia antisentido") y su complemento ("secuencia de sentidos"). El ARN diana, que está codificado por el primer polinucleótido de interés que puede ser una molécula de ARN (por ejemplo, una molécula de ARN viral) o preferentemente una molécula de ADN que se transcribe (o replica) en la célula para producir el ARN diana, se puede producir por el genoma de la célula, o puede ser producido por un patógeno de la célula como un virus. Por tanto, debido a los patrones de expresión temporal y/o espacial de un gen endógeno, o la ausencia del patógeno, el ARNdc puede no estar siempre presente en la célula al mismo tiempo que el ARN diana.

Tal como apreciaría el experto en la materia, para ejercer el efecto deseado, un ARNdc dirigido al producto de transcripción de un gen endógeno se expresará al menos en parte al mismo tiempo que el gen endógeno. Aunque, tal como se describe más adelante, el ARNdc puede comprender regiones de una sola cadena, la región de doble cadena comprende una secuencia (secuencia antisentido) que es complementaria con una región de la diana. Normalmente, la región complementaria tiene al menos 19 nucleótidos de longitud, preferentemente 19-30 nucleótidos para su uso en células animales de vertebrados, tales como células de mamífero, más preferentemente 19-25 nucleótidos, lo más preferentemente de 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos de longitud. La complementariedad puede ser parcial o completa con la región del ARN diana. La complementariedad parcial, particularmente en el contexto de un ARN diana en una célula animal tal como una célula animal de vertebrado o una célula animal de mamífero incluye preferentemente una región de al menos 6 nucleótidos consecutivos, preferentemente al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 nucleótidos consecutivos, y preferentemente incluye los nucleótidos consecutivos 2-8 de la secuencia de nucleótidos contando desde el extremo 5'.

En el caso de las células vegetales, la complementariedad es preferentemente complementariedad completa a lo largo de una región de 19, 20 o 21 nucleótidos consecutivos, o a lo largo de una región de al menos 30 nucleótidos, al menos 50 nucleótidos o al menos 100 nucleótidos cuando la molécula de ARNdc es un ARN en horquilla. La complementariedad en el contexto de este párrafo incluye los pares de bases G:U, así como los pares de bases G:C y A:U.

ARN de interferencia

El ARN de interferencia (ARNi) es particularmente útil para inhibir específicamente la producción de una proteína particular o ARN funcional. Esta tecnología se basa en la presencia de moléculas de ARNdc que contienen una secuencia que es esencialmente idéntica al ARNm del gen de interés o parte del mismo. De manera conveniente, el ARNdc puede producirse a partir de un único promotor en un vector recombinante o célula hospedadora, donde las secuencias sentido y antisentido están flanqueadas por una secuencia no relacionada que permite que las secuencias sentido y antisentido se hibriden para formar la molécula de ARNdc con una secuencia no relacionada que forma una estructura de bucle, aunque una secuencia con identidad para el ARN diana o su complemento puede formar la estructura de bucle. Normalmente, el ARNdc está codificado por una construcción de ADN de doble cadena que tiene secuencias de sentido y antisentido en una estructura de repetición invertida, dispuesta como un palíndromo interrumpido, donde las secuencias repetidas se transcriben para producir las secuencias de hibridación en la molécula de ARNdc, y la secuencia de interrupción se transcribe para formar el bucle en la molécula de ARNdc. El diseño y la producción de moléculas de ARNdc adecuadas está dentro de la capacidad de una persona experta en la materia, particularmente considerando Waterhouse et. al. (1998), Smith et al. (2000), WO 99/32619, WO 99/53050, WO 99/49029, y WO 01/34815.

En un ejemplo, se introduce un ADN que dirige la síntesis de al menos uno o más productos de ARN de doble cadena con homología, preferentemente al menos 19 nucleótidos consecutivos complementarios con una región de, un ARN diana, para que se inactive. Por lo tanto, el ADN comprende secuencias tanto sentido como antisentido que, cuando se transcriben en ARN, pueden hibridarse para formar la región de ARN de doble cadena. En una realización de la invención, las secuencias sentido y antisentido están separadas por una región espaciadora que comprende un intrón que, cuando se transcribe en ARN, se corta y empalma. Se ha demostrado que esta disposición da como resultado una mayor eficiencia del silenciamiento génico. La región de doble cadena puede comprender una o dos moléculas de ARN, transcritas a partir de una o dos regiones de ADN. Se cree que la presencia de la molécula de doble cadena desencadena una respuesta de un sistema endógeno que destruye tanto el ARN de doble cadena como el transcrito de ARN homólogo del gen diana, reduciendo o eliminando de manera eficiente la actividad del gen diana.

La longitud de las secuencias sentido y antisentido que hibridan debe ser de al menos 19 nucleótidos contiguos. Se puede usar la secuencia de longitud completa correspondiente a la transcripción del gen completo. El grado de identidad de las secuencias sentido y antisentido para la transcripción diana debe ser al menos 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95-100 %. Por supuesto, la molécula de ARN puede comprender secuencias no relacionadas que pueden funcionar para estabilizar la molécula. La molécula de ARN puede expresarse bajo el control de un promotor de ARN polimerasa II o ARN polimerasa III. Los ejemplos de este último incluyen promotores de ARNt o ARNnp.

Además, los inventores han establecido que la posición de la secuencia complementaria relevante para la diana, concretamente con respecto al extremo 5' o 3', puede influir en el nivel de silenciamiento en la presencia de un polipéptido supresores del silenciamiento. Por tanto, usando un método de la invención, se puede determinar una combinación óptima de secuencia de ARNdc y supresor del silenciamiento según sea necesario.

Las moléculas preferidas de ARN de interferencia pequeño ("ARNip") comprenden una secuencia de nucleótidos que es idéntica a aproximadamente 19-21 nucleótidos contiguos del ARNm diana. Preferentemente, la secuencia de ARNip comienza con el dinucleótido AA, comprende un contenido de GC de aproximadamente 30-70 % (preferentemente 30-60 %, más preferentemente 40-60 % y más preferentemente aproximadamente 45 %-55 % y no tienen un alto porcentaje de identidad con cualquier secuencia de nucleótidos distinta de la diana en el genoma del organismo en el que se va a introducir, por ejemplo, según se determine mediante la búsqueda BLAST estándar.

microARN

Los microARN (abreviado miARN) son moléculas de ARN no codificantes generalmente de 19-25 nucleótidos (comúnmente aproximadamente 20-24 nucleótidos en plantas) que se derivan de precursores más grandes que forman estructuras imperfectas de tallo-bucle.

Los miARN se unen a secuencias complementarias en transcritos de ARN mensajero (ARNm), diana, dando normalmente como resultado la represión de la degradación de la diana y silenciamiento génico.

En una realización preferida, el miARN es un miARN artificial (fabricado por el hombre). En otras palabras, el miARN es un miARN no natural.

En una realización adicional particularmente preferida, si el ARNdc es un miARN tal como un miARN que comprende una región de ARNdc de 21 pares de bases expresados como un miARN precursor, y la célula comprende además el tercer polinucleótido exógeno, el supresor del silenciamiento es un polipéptido similar a V2 tales como los que comprenden aminoácidos que tienen una secuencia como se proporciona en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, o 38 a 51, un fragmento biológicamente activo del mismo, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 30 % idéntica a una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1, o 38 a 51.

En células vegetales, se cree que las moléculas de precursor del miARN son procesadas en gran parte en el núcleo.

El pri-miARN (que contiene una o más regiones locales de doble hebra u "horquilla", así como la "caperuza" 5' y la cola poliadenilada habituales de un ARNm) se procesa en una molécula precursora de miARN más corta que también incluye un bucle-tallo o estructura plegable y se denomina "pre-miARN". En las plantas, los pre-miARN son escindidos por distintas enzimas similares a DICER (DCL), en particular DCL-1, dando lugar a dúplex miARN:miARN*. Antes del transporte fuera del núcleo, estos dúplex son metilados. Por el contrario, las moléculas de ARN en horquilla que tienen regiones de ARNdc más largas son procesadas en particular por DCL-3 y DCL-4. La mayoría de las células de mamíferos tienen un solo polipéptido DICER que escinde múltiples estructuras de ARNdc.

En el citoplasma, la cadena de miARN del dúplex miARN:miARN se incorpora selectivamente en un complejo silenciador inducido por ARN activo (RISC) para el reconocimiento de la diana. Los complejos RISC contienen un subconjunto particular de proteínas Argonauta que ejercen una represión génica específica de la secuencia (véase, por ejemplo, Millar and Waterhouse, 2005; Pasquinelli et al., 2005; Almeida and Allshire, 2005).

Cosupresión

Los genes pueden suprimir la expresión de genes endógenos relacionados y/o transgenes ya presentes en el genoma, un fenómeno denominado silenciamiento génico dependiente de la homología. La mayoría de los casos de silenciamiento génico dependiente de la homología se dividen en dos clases: los que funcionan al nivel de transcripción del transgen y los que operan después de la transcripción.

El silenciamiento génico dependiente de la homología postranscripcional (es decir, cosupresión) describe la pérdida de expresión de un transgén y genes endógenos o virales relacionados en plantas transgénicas. La cosupresión, frecuentemente, pero no siempre, ocurre cuando los transcritos de transgenes son abundantes, y generalmente se cree que se desencadena a nivel de procesamiento, localización y/o degradación del ARNm. Existen varios modelos para explicar cómo funciona la cosupresión (véase en Taylor, 1997).

Un modelo, el modelo "cuantitativo" o "umbral de ARN", propone que las células pueden hacer frente a la acumulación de grandes cantidades de transcritos transgénicos, pero solo hasta cierto punto. Una vez que se ha cruzado ese umbral crítico, se inicia la degradación dependiente de la secuencia de los transcritos de transgenes y genes endógenos relacionados. Se ha propuesto que este modo de cosupresión puede desencadenarse después de la síntesis de moléculas de ARN de copia (ARNc) mediante la transcripción inversa del exceso de ARNm transgénico, presumiblemente por ARN polimerasas dependientes de ARN endógeno. Estos ARNc pueden hibridarse con ARNm transgénicos y endógenos, dirigiéndose los híbridos no habituales a los transcritos homólogos para la degradación. Sin embargo, este modelo no tiene en cuenta las publicaciones que sugieren que la cosupresión aparentemente puede ocurrir en ausencia de transcripción transgénica y/o sin la acumulación detectable de transcritos transgénicos.

Para tener en cuenta estos datos, un segundo modelo, el modelo "cualitativo" o de "ARN aberrante", propone que las interacciones entre el ARN transgénico y el ADN y/o entre los ADN endógenos e introducidos conducen a la metilación de las regiones transcritas de los genes. Se propone que los genes metilados producen ARN que de alguna manera son aberrantes, desencadenando sus características anómalas la degradación específica de todos los transcritos relacionados. Tales ARN aberrantes pueden ser producidos por loci transgénicos complejos, particularmente aquellos que contienen repeticiones invertidas.

Un tercer modelo propone que el emparejamiento de bases intermolecular entre transcritos, en lugar de híbridos de ARNc-ARNm generados por la acción de una ARN polimerasa dependiente de ARN, puede desencadenar la cosupresión. Tal emparejamiento de bases puede hacerse cada vez más común a medida que aumentan los niveles de transcritos, desencadenando las supuestas regiones de doble cadena la degradación dirigida de los transcritos homólogos. Un modelo similar propone el emparejamiento de bases intramolecular en lugar del emparejamiento de bases intermoleculares entre transcritos.

La cosupresión implica la introducción de una copia adicional de un gen o un fragmento del mismo en una planta en la orientación de sentido con respecto a un promotor para su expresión. Una persona experta apreciaría que el tamaño del fragmento sentido, su correspondencia con las regiones del gen diana y su grado de identidad de secuencia con el gen diana pueden variar. En algunos casos, la copia adicional de la secuencia del gen interfiere con la expresión del gen de la planta diana. Para conocer los métodos de enfoques de implementación de la cosupresión, véase los documentos WO 97/20936 y EP 0465572.

Los presentes inventores postulan que el supresores del silenciamiento V2 y sus análogos funcional suprimen la vía de cosupresión, pero no, o en menor medida, las vías de interferencia del microARN y el ARN como se ha descrito más arriba.

Polinucleótidos

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Un polinucleótido útil para la invención puede ser de origen genómico, ADNc, semisintético o sintético, de doble cadena

o cadena sencilla y en virtud de su origen o manipulación: (1) no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza, (2) está vinculado a un polinucleótido diferente al que está vinculado en la naturaleza, o (3) no ocurre en la naturaleza. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificantes que pueden o no incluir intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia y ADN quimérico que incluye construcciones de ADN.

Tal como se usa en el presente documento, el término "gen" debe tomarse en su contexto más amplio e incluye las secuencias de desoxirribonucleótidos que comprenden la región transcrita y, si se traduce, la región codificante de proteínas, de un gen estructural e incluye secuencias ubicadas adyacentes a la región codificante de ambos extremos 5' y 3' para una distancia de al menos aproximadamente 2 kb en cada extremo y que están implicadas en la expresión del gen. En este sentido, el gen incluye señales de control, tal como promotores, potenciadores, señales de terminación y/o poliadenilación que están naturalmente asociadas con un gen dado, o señales de control heterólogas, en cuyo caso, el gen se denomina "gen quimérico". Las secuencias que están ubicadas en 5' de la región de codificación de proteínas y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias que están ubicadas en 3' o aguas abajo de la región de codificación de proteínas y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término "gen" abarca tanto el ADNc como las formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante que puede interrumpirse con secuencias no codificantes denominadas "intrones", "regiones intermedias" o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN nuclear (nRNA). Los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o "se cortan y empalman" del transcrito nuclear o primario; por lo tanto, los intrones están ausentes en el transcrito de ARNm. El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido naciente. El término "gen" incluye una molécula sintética o de fusión que codifica la totalidad o parte de las proteínas descritas en el presente documento y una secuencia de nucleótidos complementaria con cualquiera de las anteriores.

Tal como se usa en el presente documento, "ADN quimérico" se refiere a cualquier molécula de ADN que no se encuentra de forma natural en la naturaleza; también denominado en el presente documento "construcción de ADN". Normalmente, el ADN quimérico comprende secuencias reguladoras y transcritas o codificadoras de proteínas que no se encuentran de forma natural juntas en la naturaleza. Por consiguiente, el ADN quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias de codificación que derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias de codificación derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente que la encontrada en la naturaleza. El marco de lectura abierto puede o no estar vinculado a sus elementos reguladores naturales aguas arriba y aguas abajo. El marco de lectura abierto puede incorporarse, por ejemplo, en el genoma de una planta, en una ubicación no natural, o en un replicón o vector donde no se encuentra naturalmente, como un plásmido bacteriano o un vector viral. La expresión "ADN quimérico" no se limita a moléculas de ADN que son replicables en un hospedador, por ejemplo, sino que incluye ADN capaz de ser ligado en un replicón mediante, por ejemplo, secuencias adaptadoras específicas.

Un "transgén" es un gen que ha sido introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación. Las expresiones y términos "genéticamente modificado", "transgénico", "recombinante" y sus variaciones incluyen introducir un gen en una célula mediante transformación o transducción, mutando un gen en una célula y alterando o modulando genéticamente la regulación de un gen en una célula, o la progenie de cualquier célula modificada como se describe anteriormente.

Una "región genómica", como se usa en el presente documento, se refiere a una posición dentro del genoma en la que se ha insertado un transgen, o grupo de transgenes (también denominado en el presente documento como un grupo), o predecesor del mismo. Dichas regiones solo comprenden nucleótidos que han sido incorporados por la intervención del hombre, como por los métodos descritos en el presente documento.

Con respecto a los polinucleótidos definidos, se apreciará que las cifras del porcentaje de identidad superiores a las proporcionadas anteriormente abarcarán realizaciones preferidas. Por tanto, cuando sea aplicable, a la luz de las cifras de identidad mínimas de un porcentaje, se prefiere que el polinucleótido comprenda una secuencia de polinucleótidos que sea al menos el 40 %, más preferentemente al menos el 50%, más preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 65 %, más preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 91 %, más preferentemente al menos el 92 %, más preferentemente al menos el 93 %, más preferentemente al menos el 94 %, más preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 96 %, más preferentemente al menos el 97 %, más preferentemente al menos el 98 %, más preferentemente al menos el 99 %, más preferentemente al menos el 99,1 %, más preferentemente al menos el 99,2 %, más preferentemente al menos el 99,3 %, más preferentemente al menos el 99,4 %, más preferentemente al menos el 99,5 %, más preferentemente al menos el 99,6 %, más preferentemente al menos el 99,7 %, más preferentemente al menos 99,8 % e incluso más preferentemente al menos 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO. nominada relevante.

Un polinucleótido útil para la presente invención puede hibridar selectivamente, en condiciones rigurosas, con un polinucleótido definido en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, condiciones rigurosas

son aquellas que: (1) emplean durante la hibridación un agente desnaturante, tal como formamida, por ejemplo, formamida 50 % (v/v) con seroalbúmina bovina 0,1 % (p/v), Ficoll 0,1 %, polivinilpirrolidona 0,1 %, tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C; o (2) emplean formamida 50 %, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico 0,1 %, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sonicado (50 g/ml), SDS 0,1 % y sulfato de dextrano 10 % a 42 °C en 0,2 x SSC y SDS 0,1 % y/o (3) emplean una fuerza iónica baja y una temperatura de lavado alta, por ejemplo, NaCl 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/SDS 0,1 % a 50 °C. Los polinucleótidos más cortos, por ejemplo, aquellos que tienen 19-24 nucleótidos, requieren condiciones menos rigurosas para la hibridación, como bien entienden los expertos en la materia. Por ejemplo, las condiciones de hibridación pueden omitir la formamida, y las condiciones de lavado usan una temperatura de 37 °C con un contenido mayor de sal y concentraciones más bajas de SDS.

Los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden poseer, en comparación con las moléculas naturales, una o más mutaciones que son deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de nucleótidos. Los polinucleótidos que tienen mutaciones en relación con una secuencia de referencia pueden ser de origen natural (es decir, aislados de una fuente natural) o sintéticos (por ejemplo, realizando mutagénesis dirigida al sitio o mezcla de ADN en el ácido nucleico).

Vector de expresión

Tal como se usa en el presente documento, un "vector de expresión" es un vector de ADN o ARN que es capaz de transformar una célula hospedadora y efectuar la expresión de uno o más polinucleótidos especificados. Preferentemente, el vector de expresión también es capaz de replicarse dentro de la célula hospedadora. Los vectores de expresión son normalmente virus o plásmidos. Los vectores de expresión descritos en el presente documento incluyen cualquier vector que funcione (es decir, expresión génica directa) en células hospedadoras de la presente invención, incluyendo en hongos, endoparásitos, artrópodos, animales, algas y células vegetales. Los vectores de expresión particularmente preferidos pueden dirigir la expresión génica en células de levadura, animales y/o vegetales.

"Unido operativamente" como se usa en el presente documento, se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de ácido nucleico (por ejemplo, ADN). Normalmente, se refiere a la relación funcional del elemento regulador transcripcional (promotor) con una secuencia transcrita. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante de un polinucleótido definido en el presente documento, si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula apropiada. En general, los elementos reguladores de la transcripción del promotor que están operativamente unidos a una secuencia transcrita son físicamente contiguos a la secuencia transcrita, es decir, actúan en cis. Sin embargo, algunos elementos reguladores de la transcripción, como los potenciadores, no necesitan ser físicamente contiguos o estar ubicados cerca de las secuencias de codificación cuya transcripción potencian.

Los vectores de expresión descritos en este documento contienen secuencias reguladoras tales como secuencias de control de la transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula hospedadora y que controlan la expresión de polinucleótidos descritos en este documento. En particular, los vectores de expresión descritos en el presente documento incluyen secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias que controlan el inicio, el alargamiento y la terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan el inicio de la transcripción, como las secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Las secuencias de control de la transcripción adecuadas incluyen cualquier secuencia de control de la transcripción que pueda funcionar en al menos una de las células recombinantes de la presente invención. La elección de las secuencias reguladoras utilizadas depende del organismo diana, tal como una planta y/u órgano o tejido diana de interés. Dichas secuencias reguladoras pueden obtenerse de cualquier organismo eucariota tal como plantas o virus vegetales, o pueden sintetizarse químicamente. Los expertos en la materia conocen una variedad de dichas secuencias de control de la transcripción. Las secuencias de control de la transcripción particularmente preferidas son promotores activos en la dirección de la transcripción en plantas, ya sea constitutivamente o específicas de etapa y/o tejido, dependiendo del uso de la planta o parte o partes de la misma.

Se han descrito varios vectores adecuados para la transfección estable de células vegetales o para el establecimiento de plantas transgénicas por ejemplo en, Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, Supl. 1987, Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989, and Gelvin et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990. Normalmente, los vectores de expresión de plantas incluyen, por ejemplo, uno o más genes de plantas clonados bajo el control transcripcional de secuencias reguladoras 5' y 3' y un marcador seleccionable dominante. Dichos vectores de expresión de plantas también pueden contener una región reguladora del promotor (por ejemplo, una región reguladora que controla la expresión inducible o constitutiva, regulada por el medio ambiente o el desarrollo, o específica de células o tejidos), un sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma, una señal de procesamiento del ARN, un sitio de terminación de la transcripción y/o una señal de poliadenilación.

Se han descrito varios promotores constitutivos que son activos en las células vegetales. Los promotores adecuados para la expresión constitutiva en plantas incluyen, pero sin limitación, el promotor 35S del virus del mosaico de la

coliflor (CaMV), el virus del mosaico Figwort (FMV) 35S, el promotor del virus del baciliforme de la caña de azúcar, el promotor del virus del moteado amarillo de commelina, el promotor fotoinducible de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bis-fosfato carboxilasa, el promotor de la triosefosfato isomerasa citosólica del arroz, el promotor de la adenina fosforribosiltransferasa de *Arabidopsis*, el promotor del gen de la actina 1 del arroz, los promotores de la manopina sintasa y la octopina sintasa, el promotor Adh, el promotor de la sacarosa sintasa, el promotor del complejo del gen R y el promotor del gen de la proteína de unión a clorofila α/β . Estos promotores se han utilizado para crear vectores de ADN que se han expresado en plantas, véase por ejemplo, el documento WO 84/02913. Todos estos promotores se han utilizado para crear varios tipos de vectores de ADN recombinante que se pueden expresar en plantas.

Para el fin de la expresión en los tejidos fuente de la planta, tales como la hoja, semilla, raíz o tallo, se prefiere que los promotores utilizados en la presente invención tengan una expresión relativamente alta en estos tejidos específicos. Para este fin, se puede elegir entre varios promotores para genes con expresión específica de tejido o célula o aumentada. Los ejemplos de tales promotores publicados en la bibliografía incluyen, el promotor de la glutamina sintetasa GS2 del cloroplasto de guisante, el promotor de la cloroplasto fructosa-1,6-bisfosfatasa del trigo, el promotor fotosintético nuclear ST-LS1 de la patata, el promotor de la serina/treonina quinasa y el promotor de la glucoamilasa (CHS) de *Arabidopsis thaliana*. También se han descrito que son activos en tejidos fotosintéticamente activos el promotor de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa del alerce oriental (*Larix laricina*), el promotor del gen Cab, Cab6, del pino, el promotor del gen Cab-1 del trigo, el promotor del gen Cab-1 de la espinaca, el promotor del gen Cab 1R del arroz, el promotor de la piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK) de *Zea mays*, el promotor del gen Lhcb1*2 del tabaco, el promotor del importador de la sacarosa-H³⁰ Suc2 de *Arabidopsis thaliana* y el promotor de los genes de la proteína de la membrana tilacoide de la espinacas (PsaD), PsaF, PsaE, PC, FNR, AtpC, AtpD, Cab, RbcS). Otros promotores para las proteínas de unión a clorofila α/β también pueden utilizarse en la presente invención, tales como los promotores del gen Lhcb y el gen PsbP de la mostaza blanca (*Sinapis alba*).

Una variedad de promotores de genes de plantas que están regulados en respuesta a señales ambientales, hormonales, químicas y/o de desarrollo, también se pueden usar para la expresión de genes de proteínas de unión a ARN en células vegetales, incluidos los promotores regulados por (1) calor, (2) luz (por ej., promotor RbcS-3A del guisante, promotor RbcS de maíz), (3) hormonas, como el ácido abscísico, (4) daños (por eje., Wun1) o (5) sustancias químicas, tales como jasmonato de metilo, ácido salicílico, hormonas esteroideas, alcohol, Safeners (WO 97/06269), o también puede ser ventajoso emplear (6) promotores específicos de órganos.

Con el fin de expresarse en los tejidos sumidero de la planta, como el tubérculo de la planta de la patata, el fruto del tomate o la semilla de soja, colza, algodón, *Zea mays*, trigo, arroz y cebada, se prefiere que los promotores utilizados en la presente invención tengan una expresión relativamente alta en estos tejidos específicos. Se conocen varios promotores de genes con expresión específica o mejorada de tubérculos, incluido el promotor de la patatina de clase I, el promotor de los genes ADPGPP del tubérculo de la patata, las subunidades grandes y pequeñas, el promotor de la sacarosa sintasa, el promotor de la mayoría proteínas de tubérculos, incluidos los complejos de proteínas de 22 kD y los inhibidores de proteinasas, el promotor del gen de la almidón sintasa unido a gránulos (GBSS) y otros promotores de patatinas de clase I y II. También se pueden usar otros promotores para expresar una proteína en tejidos específicos tales como semillas o frutas. Se pueden usar el promotor de la β -conglucina u otros promotores específicos de semillas tales como los promotores de la napina, zeína, linina y faseolina. También se pueden usar promotores específicos de la raíz. Un ejemplo de dicho promotor es el promotor del gen de la quitinasa ácida. La expresión en el tejido de la raíz también podría lograrse utilizando los subdominios específicos de la raíz del promotor CaMV 35S que se han identificado.

En una realización, el promotor dirige la expresión en tejidos y órganos en los que tiene lugar la biosíntesis de lípidos. Dichos promotores actúan en el desarrollo de la semilla en un momento adecuado para modificar la composición lipídica en las semillas.

En una realización adicional particularmente preferida, el promotor es un promotor específico de un órgano de almacenamiento de la planta. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "promotor específico de un órgano de almacenamiento de la planta" se refiere a un promotor que preferentemente, en comparación con otros tejidos de la planta, dirige la transcripción génica en un órgano de almacenamiento de una planta. Preferentemente, el promotor solo dirige la expresión de un gen de interés en el órgano de almacenamiento, y/o la expresión del gen de interés en otras partes de la planta, como las hojas, y no es detectable por análisis de transferencia Northern y/o RT-PCR. Normalmente, el promotor impulsa la expresión de genes durante el crecimiento y desarrollo del órgano de almacenamiento, en particular durante la fase de síntesis y acumulación de compuestos de almacenamiento en el órgano de almacenamiento. Dichos promotores pueden impulsar la expresión génica en todo el órgano de almacenamiento de la planta o solo en una parte del mismo, como la capa de semilla, el embrión o cotiledón o cotiledones en semillas de plantas dicotiledóneas o el endospermo o la capa de aleurona de semillas de plantas monocotiledóneas.

En una realización, el promotor específico de un órgano de almacenamiento de la planta es un promotor específico de la semilla. En una realización más preferida, el promotor dirige preferentemente la expresión en los cotiledones de una planta dicotiledónea o en el endospermo de una planta monocotiledónea, respecto a la expresión en el embrión de la

semilla o respecto a otros órganos de la planta, como las hojas. Los promotores preferidos para la expresión específica de semillas incluyen: 1) promotores de genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis y acumulación de lípidos en semillas tales como desaturasas y elongasas, 2) promotores de genes que codifican proteínas de almacenamiento de semillas y 3) promotores de genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de
 5 carbohidratos y acumulación en semillas. Promotores específicos de semillas que son adecuados son, el promotor del gen de la napina de la colza (US 5.608.152), el promotor USP de *Vicia faba* (Baumlein et al., 1991), el promotor de la oleosina de *Arabidopsis* (WO 98/45461), el promotor de la faseolina de *Phaseolus vulgaris* (US 5.504.200), el promotor Bce4 de *Brassica* (WO 91/13980), o el promotor B4 de la legumina (Baumlein et al., 1992), los promotores que conducen a la expresión específica de la semilla en monocotiledóneas como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz y
 10 similares. Los promotores notables que son adecuados son el promotor del gen *lpt2* o *lpt1* de la cebada (WO 95/15389 y WO 95/23230), o los promotores descritos en WO 99/16890 (promotores del gen de la hordeína de la cebada, el gen de la glutelina del arroz, el gen de la orizina del arroz, el gen de la prolamina del arroz, el gen de la gliadina del trigo, el gen de la glutelina del trigo, el gen de la zeína del maíz, el gen de la glutelina de la avena, el gen de la kasirina del sorgo, el gen de la secalina del centeno). Otros promotores incluyen los descritos por Broun et al. (1998), Potenza et al. (2004), US 20070192902 y US 20030159173. En una realización, el promotor específico de la semilla se expresa preferentemente en partes definidas de la semilla, tales como el cotiledón o cotiledones o el endospermo. Los ejemplos de promotores específicos de cotiledón incluyen, pero sin limitación, el promotor FP1 (Ellerstrom et al., 1996), el promotor de la legumina del guisante (Perrin et al., 2000), y el promotor de la fitohemaglutinina de la judía (Perrin et al., 2000). Los ejemplos de promotores específicos de endospermo incluyen, pero sin limitación, el promotor de la zeína-1 del maíz (Chikwamba et al., 2003), el promotor de la glutelina-1 del arroz (Yang et al., 2003), el promotor de la D-hordeína de cebada (Horvath et al., 2000) y los promotores de la glutenina HMW de trigo (Alvarez et al., 2000). En una realización adicional, el promotor específico de la semilla no se expresa, o solo se expresa a un nivel bajo, en el embrión y/o después de que la semilla germina.

25 En otra realización, el promotor específico de un órgano de almacenamiento de la planta es un promotor específico del tubérculo. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, la patatina de la patata B33, los promotores PAT21 y GBSS, así como el promotor de la esporamina de la batata (para una revisión véase, Potenza et al., 2004). En una realización preferida, el promotor dirige la expresión preferentemente en la médula del tubérculo, en relación con las capas externas (piel, corteza) o el embrión del tubérculo.

30 En otra realización, el promotor específico de un órgano de almacenamiento de la planta es un promotor específico de fruto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, los promotores E8 y Pds de la poligalacturonasa del tomate, así como el promotor de la ACC oxidasa de la manzana (para una revisión véase, Potenza et al., 2004). En una realización preferida, el promotor dirige preferentemente la expresión en las partes comestibles de la fruta, por ejemplo, la médula de la fruta, en relación con la piel de la fruta o las semillas dentro de la fruta.

Cuando hay múltiples promotores presentes, cada promotor puede ser independientemente el mismo o diferente.

40 La secuencia líder 5' no traducida puede derivarse del promotor seleccionado para expresar la secuencia génica heteróloga del polinucleótido, o puede ser heteróloga con respecto a la región codificante de la enzima a producir, y puede modificarse específicamente si se desea como para aumentar la traducción de ARNm. Para una revisión de la optimización de la expresión de transgenes, véase Koxiel et al. (1996). Las regiones 5' no traducidas también pueden obtenerse a partir de ARN virales vegetales (virus del mosaico del tabaco, virus del grabado del tabaco, virus del mosaico enano de maíz, virus del mosaico de alfalfa, entre otros) a partir de genes eucariotas adecuados, genes
 45 vegetales (secuencia líder del gen de la proteína de unión a clorofila a/b de trigo y maíz), o de una secuencia genética sintética. La presente invención no se limita a construcciones en las que la región no traducida se deriva de la secuencia 5' no traducida que acompaña a la secuencia promotora. La secuencia líder también podría derivarse de un promotor o secuencia codificante no relacionados. Las secuencias líderes útiles en el contexto de la presente invención comprenden la secuencia líder Hsp70 de maíz (US 5.362.865 y US 5.859.347), y el elemento TMV.

50 La terminación de la transcripción se lleva a cabo mediante una secuencia de ADN no traducida 3' unida operativamente en el vector de expresión al polinucleótido de interés. La región 3' no traducida de una molécula de ADN recombinante contiene una señal de poliadenilación que funciona en las plantas para causar la adición de nucleótidos de adenilato al extremo 3' del ARN. La región 3' no traducida se puede obtener de varios genes que se expresan en, por ejemplo, células vegetales. La región 3' no traducida de la nopalina sintasa, la región 3' no traducida del gen de la subunidad pequeña de la Rubisco del guisante, la región 3' no traducida del gen de almacenamiento de semilla 7S de la soja se usan habitualmente para este fin. Las regiones 3' transcritas, no traducidas que contienen la señal de poliadenilato de los genes de plásmidos inductores de tumores (Ti) de *Agrobacterium* también son adecuadas.

60 Las tecnologías de ADN recombinante se pueden usar para mejorar la expresión de un polinucleótido transformado manipulando, por ejemplo, el número de copias del polinucleótido dentro de una célula hospedadora, la eficiencia con la que se transcriben esos polinucleótidos, la eficiencia con la que se traducen los transcritos resultantes, y la eficiencia de las modificaciones postraduccionales. Las técnicas recombinantes útiles para aumentar la expresión de polinucleótidos definidos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, la unión operativa del polinucleótido a un plásmido de alto número de copias, la integración de la molécula de polinucleótido en uno o más cromosomas de la célula hospedadora, la adición de secuencias de estabilidad del vector al plásmido, sustituciones o modificaciones
 65

de señales de control de la transcripción (por ej., promotores, operadores, potenciadores), sustituciones o modificaciones de señales de control de la transcripción (por ej., sitios de unión a ribosomas, secuencias de Shine-Dalgarno), modificación del polinucleótido para corresponder al uso del codón de la célula hospedadora y la eliminación de secuencias que desestabilizan los transcritos.

5 En una realización, si la célula es una célula vegetal, el segundo polinucleótido exógeno se introduce en la célula en un vector distinto de un vector viral.

10 Los vectores recombinantes también pueden contener: (a) una o más señales secretoras que codifican secuencias de péptidos señal, para permitir que un polipéptido expresado definido en este documento sea secretado de la célula que produce el polipéptido, o que proporcione la localización del polipéptido expresado, por ejemplo, para la retención del polipéptido en el retículo endoplasmático (ER) en la célula, o la transferencia a un plastidio, y/o (b) contienen secuencias de fusión que conducen a la expresión de moléculas de ácido nucleico como proteínas de fusión. Los ejemplos de segmentos de señal adecuados incluyen cualquier segmento de señal capaz de dirigir la secreción o localización de un polipéptido definido en el presente documento. Los segmentos de señal preferidos incluyen, pero sin limitación, el péptido señal de *Nicotiana nectarin* (US 5.939.288), el péptido señal de la extensina del tabaco o la señal de la proteína de unión al cuerpo oleoso de la oleosina de la soja. Los vectores recombinantes también pueden incluir secuencias intermedias y/o no traducidas que rodean y/o están dentro de la secuencia de ácido nucleico de un polinucleótido definido en el presente documento.

20 Para facilitar la identificación de transformantes, el vector recombinante comprende deseablemente un gen marcador seleccionable o detectable, o además de, la secuencia de ácido nucleico de un polinucleótido definido en el presente documento. Por "gen marcador" se entiende un gen que imparte un fenotipo distinto a las células que expresan el gen marcador y, por lo tanto, permite que dichas células transformadas se distingan de las células que no tienen el marcador. Un gen marcador seleccionable confiere un rasgo para el cual se puede "seleccionar" en función de la resistencia a un agente selectivo (por ej., un herbicida, antibiótico, radiación, calor u otro tratamiento que daña las células no transformadas). Un gen marcador seleccionable (o gen indicador) confiere un rasgo que no se puede identificar mediante observación o prueba, es decir, mediante "detección" (por ej, β -glucuronidasa, luciferasa, GFP u otra actividad enzimática no presente en las células no transformadas). El gen marcador y la secuencia de nucleótidos de interés no tienen que estar unidos, ya que la co-transformación de genes no unidos como se describe, por ejemplo, en el documento US 4.399.216, también es un proceso eficiente en, por ejemplo, la transformación de plantas. La elección real de un marcador no es crucial siempre que sea funcional (es decir, selectiva) en combinación con las células de elección, como una célula vegetal.

35 Ejemplos de marcadores seleccionables para la selección de transformantes de plantas incluyen, pero sin limitación, un gen *hyg* que codifica la resistencia a la higromicina B; un gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) que confiere resistencia a la kanamicina, paromomicina, G418; un gen de la glutatión-S-transferasa de hígado de rata que confiere resistencia a los herbicidas derivados de glutatión como, por ejemplo, se describe en el documento EP 256223; un gen de la glutamina sintetasa que confiere, tras la sobreexpresión, resistencia a los inhibidores de la glutamina sintetasa, como la fosfinotricina como se describe, por ejemplo, en el documento WO 87/05327; un gen de la acetiltransferas de *Streptomyces viridochromogenes* que confiere resistencia al agente selectivo fosfinotricina como se describe, por ejemplo, se describe en el documento EP 275957; un gen que codifica una 5-enolshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que confiere tolerancia a la N-fosfonometilglicina como se describe, por ejemplo, por Hinchey et al. (1988); un gen *bar* que confiere resistencia contra bialafos como se describe, por ejemplo, en el documento WO91/02071; un gen de la nitrilasa tal como *bxn* de *Klebsiella ozaenae* que confiere resistencia al bromoxinilo (Staker et al., 1988); un gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) que confiere resistencia al metotrexato (Thillet et al., 1988); un gen mutante de la acetolactato sintasa (ALS) que confiere resistencia a la imidazolinona, sulfonilurea u otras sustancias químicas que inhiben la ALS (EP 154.204); un gen mutado de la antranilato sintasa que confiere resistencia al 5-metil triptófano; o un gen de la dalapon deshalogenasa que confiere resistencia al herbicida.

50 Los marcadores detectables preferidos incluyen, pero sin limitación, un gen *uidA* que codifica una enzima β -glucuronidasa (GUS) para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos; un gen de la β -galactosidasa para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos; un gen de la aecurina (Prasher et al., 1985) que puede emplearse en la detección de bioluminiscencia sensible al calcio; un gen de proteína verde fluorescente (Niedetz et al., 1995) o derivados del mismo; o un gen la luciferasa (*luc*) (Ow et al., 1986) que permite la detección por bioluminiscencia. Por "molécula indicadora" se entiende una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente identificable que facilita la determinación de la actividad del promotor por referencia al producto proteico.

60 Preferentemente, el vector recombinante se incorpora de manera estable en el genoma de la célula tal como la célula vegetal. Por consiguiente, el vector recombinante puede comprender elementos apropiados que permiten que el vector se incorpore en el genoma o en un cromosoma de la célula.

Ácidos nucleicos de transferencia

65 Los ácidos nucleicos de transferencia pueden usarse para suministrar un polinucleótido exógeno a una célula y comprenden una, preferiblemente dos, secuencias limítrofes y un polinucleótido de interés. El ácido nucleico de

transferencia puede o no codificar un marcador seleccionable. Preferentemente, el ácido nucleico de transferencia forma parte de un vector binario en una bacteria, donde el vector binario comprende además elementos que permiten la replicación del vector en la bacteria, la selección o el mantenimiento de células bacterianas que contienen el vector binario. Tras la transferencia a una célula eucariota, el componente de ácido nucleico de transferencia del vector binario es capaz de integrarse en el genoma de la célula eucariota.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico de transferencia extracromosómico" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de transferirse desde una bacteria tal como *Agrobacterium* sp., a una célula eucariota como una célula de hoja vegetal. Un ácido nucleico de transferencia extracromosómico es un elemento genético que es conocido como un elemento capaz de ser transferido, con la posterior integración de una secuencia de nucleótidos contenida dentro de sus flancos en el genoma de la célula receptora. A este respecto, un ácido nucleico de transferencia está flanqueado, normalmente, por dos secuencias "flanqueantes", aunque en algunos casos se puede usar un único flanco en un extremo y el segundo extremo del ácido nucleico transferido se genera aleatoriamente en el proceso de transferencia. Un polinucleótido de interés se coloca normalmente entre la secuencia del tipo flanco izquierdo y la secuencia del tipo flanco derecho de un ácido nucleico de transferencia. El polinucleótido contenido dentro del ácido nucleico de transferencia puede estar operativamente unido a una variedad de diferentes elementos reguladores promotores y terminadores que facilitan su expresión, es decir, la transcripción y/o traducción del polinucleótido. Los ADN de transferencia (ADN-T) de *Agrobacterium* sp. tales como *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*, y sus variantes/mutantes artificiales son probablemente los ejemplos mejor caracterizados de ácidos nucleicos de transferencia. Otro ejemplo es el ADN-P ("ADN de la planta") que comprende secuencias de tipo flanqueante del ADN-T de las plantas.

Tal como se usa en el presente documento, "ADN-T" se refiere, por ejemplo, al ADN-T de un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* o de un plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* o variantes artificiales del mismo que funcionan como un ADN-T. El ADN-T puede comprender un ADN-T completo, incluyendo las secuencias flanqueantes derecha e izquierda, pero solo necesita comprender las secuencias mínimas requeridas en *cis* para la transferencia, es decir, la secuencia flanqueante derecha y el ADN-T. Los ADN-T descritos en el presente documento tienen insertado, en cualquier lugar entre las secuencias flanqueantes derecha e izquierda (si están presentes), el polinucleótido de interés flanqueado por sitios diana para una recombinasa específica del sitio. Los factores de codificación de secuencias requeridos en *trans* para transferir el ADN-T a una célula vegetal tal como los genes *vir*, se pueden insertar en el ADN-T, o pueden estar presentes en el mismo replicón que el ADN-T, o preferentemente están en *trans* en un replicón compatible en el hospedador *Agrobacterium*. Tales "sistemas de vectores binarios" son bien conocidos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, "ADN P" se refiere a un ácido nucleico de transferencia aislado de un genoma de planta, o variantes/mutantes artificiales del mismo, y comprende en cada extremo, o solo en un extremo, una secuencia de tipo flanqueante del ADN-T. La secuencia de tipo flanqueante comparte preferentemente al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95%, pero menos del 100 % de identidad de secuencia, con una secuencia flanqueante de ADN-T de una *Agrobacterium* sp. tal como *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Por tanto, los ADN-P pueden usarse en lugar de los ADN-T para transferir una secuencia de nucleótidos contenida dentro del ADN-P de, por ejemplo *Agrobacterium*, a otra célula. El ADN-P, antes de la inserción del polinucleótido exógeno que se va a transferir, puede modificarse para facilitar la clonación y preferentemente no debe codificar ninguna proteína. El ADN-P se caracteriza porque contiene, al menos, una secuencia flanqueante derecha y preferentemente también una secuencia flanqueante izquierda.

Tal como se usa en el presente documento, una secuencia "flanqueante" de un ácido nucleico de transferencia puede aislarse de un organismo seleccionado tal como una planta o bacteria, o ser una variante/mutante artificial de la misma. La secuencia flanqueante promueve y facilita la transferencia del polinucleótido al que está unida y puede facilitar su integración en el genoma de la célula receptora. En una realización, una secuencia flanqueante tiene entre 5-100 pares de bases (pb) de longitud, 10-80 pb de longitud, 15-75 pb de longitud, 15-60 pb de longitud, 15-50 pb de longitud, 15-40 pb de longitud, 15-30 pb de longitud, 16-30 pb de longitud, 20-30 pb de longitud, 21-30 pb de longitud, 22-30 pb de longitud, 23-30 pb de longitud, 24-30 pb de longitud, 25-30 pb de longitud o 26-30 pb de longitud. Las secuencias flanqueantes del ADN-T de *Agrobacterium* sp. son bien conocidas en la técnica e incluyen las descritas en Lacroix et al. (2008), Tzfira and Citovsky (2006) and Glevin (2003).

Aunque tradicionalmente solo se han usado *Agrobacterium* sp. para transferir genes a células vegetales, ahora existen numerosos sistemas que se han identificado/desarrollado que actúan de forma similar a *Agrobacterium* sp. Recientemente se han modificado genéticamente varias especies que no son de *Agrobacterium* para ser competentes para la transferencia de genes (Chung et al., 2006); Broothaerts et al., 2005). Estas incluyen *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti* y *Mezorhizobium loti*. Las bacterias se hacen competentes para la transferencia de genes al proporcionar a las bacterias la maquinaria necesaria para el proceso de transformación, es decir, un conjunto de genes de virulencia codificados por un plásmido Ti de *Agrobacterium* y el segmento de ADN-T que reside en un plásmido binario pequeño, independiente. Las bacterias diseñadas de esta manera son capaces de transformar diferentes tejidos vegetales (discos de hojas, callos y tejidos ovales), monocotiledóneas o dicotiledóneas, y varias especies diferentes de plantas (por ejemplo, tabaco, arroz).

La transferencia directa de plásmidos de expresión eucariotas de bacterias a hospedadores eucariotas se logró por primera vez hace varias décadas mediante la fusión de células de mamífero y protoplastos de *Escherichia coli* portadora de plásmidos (Schaffner, 1980). Desde entonces, el número de bacterias capaces de suministrar genes a las células de mamífero ha aumentado constantemente (Weiss, 2003), siendo descubierto por cuatro grupos de forma independiente (Sizemore et al. 1995; Courvalin et al., 1995; Powell et al., 1996; Darji et al., 1997).

Se ha demostrado que *Shigella flexneri*, atenuada, *Salmonella typhimurium* o *E. coli* que se habían convertido en invasivas por el plásmido de virulencia (pWR100) de *S. flexneri* pueden transferir plásmidos de expresión después de la invasión de las células hospedadoras y la muerte intracelular debido a la atenuación metabólica. La aplicación en la mucosa, nasal u oral, de dichas *Shigella* o *Salmonella* recombinantes indujo respuestas inmunitarias contra el antígeno que fue codificado por los plásmidos de expresión. Mientras tanto, la lista de bacterias que han demostrado poder transferir plásmidos de expresión a células hospedadoras de mamíferos *in vitro* e *in vivo* se ha duplicado y se ha documentado para *S. typhi*, *S. choleraesuis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis*, y *Y. enterocolitica* (Fennelly et al., 1999; Shiau et al., 2001; Dietrich et al., 1998; Hense et al., 2001; Al-Mariri et al., 2002).

En general, se podría suponer que todas las bacterias que pueden penetrar en el citosol de la célula hospedadora (como *S. flexneri* o *L. monocytogenes*) y se lisan en su interior este compartimento celular, deberían ser capaces de transferir ADN. Esto se conoce como invasión 'abortiva' o 'suicida' ya que las bacterias tienen que lisarse para que ocurra la transferencia de ADN (Grillot-Courvalin et al., 1999). Además, incluso muchas de las bacterias que permanecen en la vacuola fagocítica (como *S. typhimurium*) también pueden hacerlo. Por tanto, las cepas recombinantes de laboratorio de *E. coli* que han sido diseñadas para ser invasivos pero no pueden escapar del fagosoma, podrían entregar su carga plasmídica al núcleo de la célula de mamífero infectada (Grillot-Courvalin et al., 1998). Además, recientemente también se ha demostrado que *Agrobacterium tumefaciens* introduce transgenes en células de mamíferos (Kunik et al., 2001).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "transfección", "transformación" y variaciones de los mismos se usan generalmente de manera intercambiable. Las células "transfectadas" o "transformadas" pueden haber sido manipuladas para introducir el o los polinucleótidos de interés, o pueden ser células de progenie derivadas de las mismas.

Células recombinantes

La invención también proporciona una célula recombinante eucariota, por ejemplo, una célula vegetal recombinante, una célula animal o célula fúngica, que es una célula hospedadora transformada con uno o más polinucleótidos o vectores definidos en el presente documento, o una combinación de los mismos. La expresión "célula recombinante" se usa indistintamente con el término "célula transgénica" en el presente documento. Las células adecuadas de la invención incluyen cualquier célula que pueda transformarse con un polinucleótido o un vector recombinante como se define en el presente documento, que codifica, por ejemplo, un polipéptido o ARNdc descrito en el presente documento. La célula recombinante puede ser una célula en cultivo, una célula *in vitro*, o en un organismo como, por ejemplo, na planta, o en un órgano como, por ejemplo, una semilla o una hoja. En una realización, la célula eucariota es una célula no humana.

Las células hospedadoras en las que se introducen el o los polinucleótidos pueden ser células no transformadas o células que ya se han transformado con al menos un ácido nucleico. Las células hospedadoras de la presente invención pueden ser endógenas (es decir, naturales) capaces de producir el o los polipéptidos definidos en el presente documento, en cuyo caso la célula recombinante derivada de la misma tiene una capacidad mejorada de producir el o los polipéptidos o puede ser capaz de producir dicho polipéptido o polipéptidos solo después de ser transformada con al menos un polinucleótido de la invención.

Las células hospedadoras de la presente invención pueden ser cualquier célula capaz de producir al menos una proteína descrita en el presente documento, e incluyen células fúngicas (incluyendo levaduras), parásitos, artrópodos, células animales y/o vegetales. Las células hospedadoras preferidas son levadura, células animales y vegetales. En una realización preferida, la célula vegetal, es una célula de semilla, en particular, una célula de un cotiledón o endospermo de una semilla. En una realización, la célula es una célula animal. La célula animal puede ser de cualquier tipo de animal como, por ejemplo, una célula animal no humano, una célula de vertebrado no humano, una célula de mamífero no humano o células de animales acuáticos tal como peces o crustáceos, invertebrados, insectos, etc. Ejemplos no limitantes de células de artrópodos incluyen células de insectos, tales como las células de *Spodoptera frugiperda* (Sf), por ejemplo, Sf9, Sf21, células de *Trichoplusia ni* y células S2 de *Drosophila*.

Las células hospedadoras pueden ser de un organismo adecuado para un proceso de fermentación, tal como, por ejemplo, *Yarrowia lipolytica* u otras levaduras.

Plantas transgénicas

La invención también proporciona una planta que comprende polinucleótidos exógenos como se define en el presente

documento, una célula de la invención, una construcción de ADN de la invención, un vector de la invención o una combinación de los mismos. El término "planta" se refiere a plantas enteras, mientras que la expresión "parte de la misma" se refiere a órganos de la planta (por ej., hojas, vástagos, raíces, flores, frutos), células individuales, (por ej., polen), semillas, partes de las semillas, como un embrión, endospermo, escutelo o cubierta de la semilla, tejido de la planta, como un tejido vascular, células vegetales y la descendencia de las mismas. Tal como se usa en el presente documento, las partes de la planta comprende células vegetales.

Tal como se usa en el presente documento, el término "planta" se usa en su sentido más amplio. Incluye, pero sin limitación, cualquier especie de hierba, planta ornamental o decorativa, cultivo o cereal (por ej., semillas oleaginosas, maíz, soja), pienso o forraje, plantas frutales u hortícolas, planta herbácea, plantas leñosas, plantas de flor o árboles. No se pretende limitar una planta a ninguna estructura en particular. También se refiere a una planta unicelular (por ej., microalga). La expresión "parte de la misma" en referencia a una planta se refiere a una célula vegetal y a una progenie de la misma, una pluralidad de células vegetales que se diferencian en gran medida en una colonia (por ejemplo, volvox), una estructura que está presente en cualquier etapa del desarrollo de una planta o un tejido vegetal. Dichas estructuras incluyen, pero sin limitación, hojas, vástagos, flores, frutos, nueces, raíces, semillas, cubierta de la semilla, embriones. La expresión "tejido vegetal" incluye tejidos vegetales diferenciados e indiferenciados, incluyendo aquellos presentes en hojas, vástagos, flores, frutos, nueces, raíces, semillas, por ejemplo, tejido embrionario, endospermo, tejido dérmico (por ej., epidermis, peridermo), tejido vascular (por ej., xilema, floema) o tejido fundamental (que comprende células de parénquima, colénquima y/o esclerénquima), así como células en cultivo (por ej., células individuales, protoplastos, callo, embriones, etc.). El tejido vegetal puede estar *in planta*, en cultivo de órganos, cultivo de tejidos o cultivo celular.

Una "planta transgénica", "planta modificada genéticamente" o variaciones de la misma se refiere a una planta que contiene un transgen que no se encuentra en una planta de tipo silvestre de la misma especie, variedad o cultivar. Las plantas transgénicas tal como se definen en el contexto de la presente invención incluyen plantas y su progenie que se han modificado genéticamente usando técnicas recombinantes para provocar la producción de al menos un polipéptido definido en el presente documento en la planta deseada o parte de la misma. La expresión "partes de plantas transgénicas" tiene el significado correspondiente.

Los términos "semilla" y "grano" se usan indistintamente en el presente documento. El "grano" se refiere al grano maduro, como el grano cosechado o el grano que todavía está en una planta pero listo para la cosecha, pero también puede referirse al grano después de la imbibición o germinación, según el contexto. El grano maduro comúnmente tiene un contenido de humedad de menos de aproximadamente 18-20 %. "Semilla en desarrollo", como se usa en el presente documento, se refiere a una semilla antes de la madurez, que se encuentra normalmente en las estructuras reproductivas de la planta después de la fertilización o la anthesis, pero también puede referirse a dichas semillas antes de la madurez que se aíslan de una planta.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "tejido vegetativo" o "parte de la planta vegetativa" o variantes de la misma es cualquier tejido, órgano o parte de la planta que no incluye los órganos para la reproducción sexual de las plantas o los órganos portadores de semillas o los tejidos u órganos estrechamente asociados como flores, frutos y semillas. Los tejidos y las partes vegetativas incluyen al menos hojas de plantas, tallos (incluidos botones florales y brotes pero excluyendo las cabezas), tubérculos y raíces, pero excluyendo las flores, polen, semillas incluyendo la cubierta de la semilla, embrión y endospermo, frutos, incluyendo tejido del mesocarpo, vainas portadoras de semillas y cabezas portadoras de semillas. En una realización, la parte vegetativa de la planta es una parte aérea de la planta. En otra u otra realización adicional, la parte de la planta vegetativa es una parte verde tal como una hoja o tallo. Las partes vegetativas incluyen aquellas partes implicadas principalmente en proporcionar o apoyar la capacidad fotosintética de la planta o función relacionada, o anclar la planta.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "órgano de almacenamiento de plantas" se refiere a una parte de una planta especializada para almacenar energía en forma de, por ejemplo, proteínas, hidratos de carbono, lípidos. Ejemplos de órganos de almacenamiento de plantas son semillas, frutos, raíces tuberosas y tubérculos. Un órgano de almacenamiento de plantas preferido de la invención es la semilla.

Las plantas proporcionadas o contempladas para su uso en la práctica de la presente invención incluyen tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. En realizaciones preferidas, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, cereales y legumbres, maíz, trigo, patatas, tapioca, arroz, sorgo, mijo, yuca, cebada o guisantes) u otras legumbres. Las plantas pueden cultivarse para la producción de raíces, tubérculos, hojas, vástagos, flores o frutos. Las plantas pueden ser hortícolas u ornamentales. Las plantas de la invención pueden ser: maíz (*Zea mays*), colza (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), otras Brassica, tales como, por ejemplo, colinabo (*Brassica napobrassica*), mostaza (*Brassica juncea*), mostaza etíope (*Brassica carinata*), crambe (*Crambe abyssinica*), camelina (*Camelina sativa*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), trébol (*Trifolium* sp.), lino (*Linum usitatissimum*), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuetes (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), batata (*Lopmoea batatus*), yuca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), plátano (*Musa* spp.), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba

(*Psidium guajava*), mango (*Mangifer indica*), aceituna (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), nuez de macadamia (*Macadamia intergrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), jatropha (*Jatropha curcas*), altramuces, eucalipto, palma, cebollino, pongamia, avena o cebada.

- 5 Otras plantas preferidas incluyen hierbas C4 tales como *Andropogon gerardi*, *Bouteloua curtipendula*, *B. gracilis*, *Buchloe dactyloides*, *Panicum virgatum*, *Schizachyrium scoparium*, especies de *Miscanthus*, por ejemplo, *Miscanthus x giganteus* y *Miscanthus sinensis*, *Sorghastrum nutans*, *Sporobolus cryptandrus*, pasto varilla (*Panicum virgatum*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), *Brachyaria*; hierbas C3 tales como *Elymus canadensis*, las legumbres *Lespedeza capitata* y *Petalostemum villosum*, la herbácea *Aster azureus*; y plantas leñosas tales como *Quercus ellipsoidalis* y *Q. macrocarpa*.

En una realización preferida, la planta es una angiosperma.

- 15 En una realización, la planta es una planta oleaginosa, preferentemente una planta de cultivo oleaginosa. Tal como se usa en el presente documento, una "planta oleaginosa" es una especie de planta utilizada para la producción comercial de lípidos a partir de las semillas de la planta. La planta oleaginosa puede ser colza (tal como canola), maíz, girasol, cártamo, soja, sorgo, lino (semilla de lino) o remolacha azucarera. Además, la planta oleaginosa puede ser otra diferente a *Brassica*, algodón, cacahuete, amapola, colinabo, mostaza, semilla de ricino, sésamo, cártamo o plantas productoras de frutos secos. La planta puede producir altos niveles de lípidos en sus frutos, como aceite de oliva, aceite de palma o de coco. Las plantas hortícolas a las que se puede aplicar la presente invención son lechuga, endivia o verduras *Brassica* incluyendo el repollo, el brócoli o la coliflor. La presente invención se puede aplicar en el tabaco, cucurbitáceas, zanahoria, fresa, tomate o pimienta.

- 25 En una realización preferida, la planta transgénica es homocigota para todos y cada uno de los genes que se han introducido (transgén) de modo que su progenie no se segrega para el fenotipo deseado. La planta transgénica también puede ser heterocigota para el o los transgenes introducidos, preferentemente uniformemente heterocigota para el transgen, tal como, por ejemplo, en la progenie F1 que se ha cultivado a partir de semilla híbrida. Dichas plantas pueden proporcionar ventajas tales como el vigor híbrido, bien conocido en la técnica.

30 *Transformación de plantas*

Las plantas transgénicas se pueden producir utilizando técnicas conocidas en la técnica, como las descritas generalmente en Slater et al., *Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press (2003), y Christou and Klee, *Handbook of Plant Biotechnology*, John Wiley and Sons (2004).

- 35 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "transformación estable", "transformado de forma estable" "integrado" y variaciones de las mismas se refieren a la integración del polinucleótido en el genoma de la célula de modo que se transfieren a las células de la progenie durante la división celular sin la necesidad de ser positivamente seleccionando por su presencia. Los transformantes estables, o la progenie de los mismos, pueden seleccionarse por cualquier medio conocido en la técnica, tales como transferencias Southern en ADN cromosómico, o hibridación de ADN genómico *in situ*.

- 45 La transferencia *mediada por Agrobacterium* es un sistema ampliamente aplicable para introducir genes en las células vegetales porque el ADN puede introducirse en las células en tejidos vegetales completos, órganos vegetales o explantes en cultivos de tejidos, ya sea para la expresión transitoria o para la integración estable del ADN en el genoma de la célula vegetal. El uso de vectores de integración en la planta *mediada por Agrobacterium* para introducir ADN en las células vegetales es bien conocido en la técnica. (véase por ejemplo, US 5177010, US 5104310, US 5004863, o US 5159135). La región de ADN a transferir se define por las secuencias flanqueantes y el ADN interviniente (ADN-T) generalmente se inserta en el genoma de la planta. Además, la integración del ADN-T es un proceso relativamente preciso que tiene como resultado pocos reordenamientos. En aquellas variedades de plantas donde la transformación *mediada por Agrobacterium* es eficiente, es el método de elección debido a la naturaleza fácil y definida de la transferencia de genes. Los vectores de transformación de *Agrobacterium* son capaces de replicación en *E. coli* así como en *Agrobacterium*, lo que permite manipulaciones convenientes como se describe (Klee et al., en: *Plant DNA Infectious Agents*, Hohn and Schell, eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 179-203 (1985)).

- 55 Los métodos de aceleración que pueden usarse incluyen, por ejemplo, bombardeo con microproyectiles y similares. Un ejemplo de un método para administrar moléculas transformantes de ácido nucleico a las células vegetales es el bombardeo con microproyectiles. Este método ha sido revisado por Yang et al., *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, Oxford Press, Oxford, Inglaterra (1994). Las partículas no biológicas (microproyectiles) pueden estar recubiertas con ácidos nucleicos y ser suministradas a las células por una fuerza propulsora. Las partículas ejemplares incluyen aquellas formadas por wolframio, oro, platino y similares. Una ventaja particular del bombardeo con microproyectiles, además de ser un medio eficaz para transformar monocotiledóneas de forma reproducible, es que no se requiere ni el aislamiento de los protoplastos, ni la susceptibilidad a la infección de *Agrobacterium*. Una realización ilustrativa de un método para administrar ADN en células de *Zea mays* por aceleración es un sistema de administración de partículas α de biolística, que puede usarse para impulsar partículas recubiertas con ADN a través de una pantalla como una pantalla de acero inoxidable o Nytex, sobre una superficie de filtro cubierta con células de

maíz cultivadas en suspensión. Un sistema de suministro de partículas adecuado para usar con la presente invención es la pistola de aceleración de helio PDS-1000/He disponible en Bio-Rad Laboratories.

5 Para el bombardeo, las células en suspensión se pueden concentrar en filtros. Los filtros que contienen las células a bombardear se colocan a una distancia apropiada debajo de la placa de detención del microproyectil. Si se desea, también se colocan una o más pantallas entre la pistola y las células que se van a bombardear.

10 Como alternativa, los embriones inmaduros u otras células diana pueden disponerse en medio de cultivo sólido. Las células a bombardear se colocan a una distancia apropiada debajo de la placa de detención del microproyectil. Si se desea, también se colocan una o más pantallas entre un dispositivo de aceleración y las células que se van a bombardear. Mediante el uso de las técnicas expuestas en este documento, se pueden obtener hasta 1000 o más focos de células que expresan transitoriamente un gen marcador. El número de células en un foco que expresa el producto génico 48 horas después del bombardeo a menudo varía de uno a diez y el promedio es de uno a tres.

15 En la transformación por bombardeo, se puede optimizar las condiciones de cultivo previas al bombardeo y los parámetros de bombardeo para producir el número máximo de transformantes estables. Tanto los parámetros físicos como biológicos para el bombardeo son importantes en esta tecnología. Los factores físicos son aquellos que implican manipular el precipitado de ADN/microproyectil o aquellos que afectan al vuelo y la velocidad de los macro o microproyectiles. Los factores biológicos incluyen todas las etapas implicadas en la manipulación de las células antes e inmediatamente después del bombardeo, el ajuste osmótico de las células diana para ayudar a aliviar el trauma asociado con el bombardeo, y también la naturaleza del ADN transformante, como el ADN linealizado o los plásmidos superenrollados intactos. Se cree que las manipulaciones previas al bombardeo son especialmente importantes para la transformación exitosa de embriones inmaduros.

25 En otra realización alternativa, los plastidios pueden transformarse de manera estable. Los métodos divulgados para la transformación de plastidios en plantas superiores incluyen el suministro de ADN con pistola de partículas que contienen un marcador seleccionable y el direccionamiento del ADN al genoma del plastidio mediante recombinación homóloga (US 5.451.513, US 5.545.818, US 5.877.402, US 5,932479 y WO 99/05265).

30 Por consiguiente, se contempla que uno desee ajustar varios aspectos de los parámetros de bombardeo en estudios a pequeña escala para optimizar completamente las condiciones. Se puede desear particularmente ajustar parámetros físicos como la distancia de separación, la distancia de vuelo, la distancia del tejido, y la presión de helio. También se pueden minimizar los factores de reducción del trauma modificando las condiciones que influyen en el estado fisiológico de las células receptoras y que, por lo tanto, pueden influir en las eficiencias de transformación e integración. 35 Por ejemplo, el estado osmótico, la hidratación del tejido y la etapa de subcultivo, o el ciclo celular de las células receptoras, pueden ajustarse para una transformación óptima. Los expertos en la materia conocerán la ejecución de otros ajustes de rutina a la luz de la presente divulgación.

40 La transformación de los protoplastos de la planta se puede lograr utilizando métodos basados en la precipitación en fosfato de calcio, tratamiento con polietilenglicol, electroporación y combinaciones de estos tratamientos. La aplicación de estos sistemas a diferentes variedades de plantas depende de la capacidad de regenerar esa variedad particular de plantas a partir de protoplastos. Se describen métodos ilustrativos para la regeneración de cereales a partir de protoplastos (Fujimura et al., 1985; Toriyama et al., 1986; Abdullah et al., 1986).

45 También se pueden usar otros métodos de transformación celular e incluyen, sin limitación, la introducción de ADN en plantas por transferencia directa de ADN en polen, por inyección directa de ADN en órganos reproductores de una planta, o por inyección directa de ADN en las células de embriones inmaduros seguido de la rehidratación de embriones desecados.

50 La regeneración, desarrollo y cultivo de plantas a partir de transformantes de protoplastos de una sola planta o de diversos explantes transformados es bien conocida en la técnica (Weissbach et al., En: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif., (1988)). Este proceso de regeneración y crecimiento normalmente incluye las etapas de seleccionar las células transformadas, cultivar esas células individualizadas mediante las etapas habituales de desarrollo embrionario a través de la etapa de plántulas enraizadas. Los embriones y semillas 55 transgénicos se regeneran de manera similar. Los brotes enraizados transgénicos resultantes se plantan luego en un medio de crecimiento de plantas apropiado tal como suelo.

60 El desarrollo o la regeneración de plantas que contienen el gen exógeno, extraño es bien conocido en la técnica. Preferentemente, las plantas regeneradas se autopolinizan para proporcionar plantas transgénicas homocigotas. De otro modo, el polen obtenido de las plantas regeneradas se cruza con plantas cultivadas con semillas de líneas agrónomicamente importantes. Por el contrario, el polen de las plantas de estas líneas importantes se utiliza para polinizar las plantas regeneradas. Una planta transgénica de la presente invención que contiene un polinucleótido deseado se cultiva usando métodos bien conocidos por un experto en la materia.

65 Los métodos para la transformación de dicotiledóneas, principalmente mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y la obtención de plantas transgénicas se ha publicado para el algodón (US 5.004.863, US 5.159.135, US 5,518,908),

soja (US 5,569,834, US 5,416,011), Brassica (US 5,463,174), cacahuete (Cheng et al., 1996), y guisante (Grant et al., 1995).

5 Los métodos para la transformación de plantas de cereales como el trigo y la cebada para introducir variación genética en la planta mediante la introducción de un ácido nucleico exógeno y para la regeneración de plantas a partir de protoplastos o embriones de plantas inmaduras son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo, CA 2,092,588, AU 61781/94, AU 667939, US 6.100.447, PCT/US97/10621, US 5.589.617, US 6,541,257, y otros métodos expuestos en el documento WO 99/14314. Preferentemente, las plantas transgénicas de trigo o cebada son producidas por procedimientos de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Los vectores que llevan el polinucleótido deseado pueden introducirse en células de trigo regenerables de plantas o explantes cultivados en tejidos, o en sistemas vegetales adecuados tales como protoplastos.

10 Las células de trigo regenerables son preferentemente del escutelo de embriones inmaduros, embriones maduros, callos derivados de estos, o el tejido meristemático.

15 Para confirmar la presencia de los transgenes en células y plantas transgénicas, se puede realizar una amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o análisis de transferencia Southern utilizando métodos conocidos por los expertos en la materia. Los productos de expresión de los transgenes pueden detectarse en cualquiera de una variedad de formas, dependiendo de la naturaleza del producto, e incluyen transferencia Western y ensayo enzimático. Una forma particularmente útil de cuantificar la expresión de proteínas y detectar la replicación en diferentes tejidos vegetales es usar un gen indicador como GUS. Una vez que se han obtenido las plantas transgénicas, se pueden cultivar para producir tejidos o partes de plantas que tengan el fenotipo deseado. El tejido de la planta o las partes de la planta, pueden cosecharse y/o recogerse la semilla. La semilla puede servir como fuente para cultivar plantas adicionales con tejidos o partes que tengan las características deseadas.

20 Una planta transgénica formada usando *Agrobacterium* u otros métodos de transformación normalmente contienen un solo locus genético en un cromosoma. Dichas plantas transgénicas pueden denominarse hemicigotas para el gen o genes añadidos. Más preferida es una planta transgénica que sea homocigota para el gen o genes añadidos, es decir, una planta transgénica que contenga dos genes añadidos, un gen en el mismo locus en cada cromosoma de un par de cromosomas. Se puede obtener una planta transgénica homocigota autofertilizando una planta transgénica hemicigota, germinando parte de la semilla producida y analizando las plantas resultantes para el gen de interés.

25 También debe entenderse que dos plantas transgénicas diferentes que contienen dos genes o loci exógenos de segregación independiente también pueden cruzarse (aparearse) para producir descendencia que contenga ambos conjuntos de genes o loci. La autofertilización de la progenie F1 apropiada puede producir plantas que son homocigotas para genes o loci exógenos. También se contempla el retrocruzamiento a una planta parental y el cruzamiento externo con una planta no transgénica, al igual que la propagación vegetativa. Se pueden encontrar descripciones de otros métodos de reproducción que se usan comúnmente para diferentes rasgos y cultivos en Fehr, En: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

40 Polipéptidos

Los términos "polipéptido" y "proteína" generalmente se usan indistintamente.

45 Un polipéptido o clase de polipéptidos puede definirse por el grado de identidad (% de identidad) de su secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia, o por tener un mayor % de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia que con otra. El % de identidad de un polipéptido con una secuencia de aminoácidos de referencia se determina normalmente mediante análisis GAP (Needleman y Wunsch, 1970; programa GCG) con parámetros de una penalización por creación de huecos = 5 y una penalización por extensión de huecos = 0,3. La secuencia de consulta tiene al menos 100 aminoácidos de longitud y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 100 aminoácidos. Aún más preferentemente, la secuencia de consulta tiene al menos 250 aminoácidos de longitud y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 250 aminoácidos. Aún más preferentemente, el análisis GAP alinea dos secuencias en toda su longitud. El polipéptido o clase de polipéptidos puede tener la misma actividad enzimática que, o una actividad diferente que, o carecer de la actividad de, el polipéptido de referencia. Preferentemente, el polipéptido tiene una actividad enzimática de al menos 10 % de la actividad del polipéptido de referencia.

60 Como se usa en el presente documento, un "fragmento biológicamente activo" es una porción de un polipéptido definido en el presente documento que mantiene una actividad definida de un polipéptido de referencia de longitud completa, por ejemplo, silenciando la actividad supresora. Los fragmentos biológicamente activos como se usan en el presente documento excluyen el polipéptido de longitud completa. Los fragmentos biológicamente activos pueden ser de cualquier tamaño siempre que mantengan la actividad definida. Preferentemente, el fragmento biológicamente activo mantiene al menos el 10 % de la actividad del polipéptido de longitud completa.

65 Con respecto a un polipéptido o enzima definido, se apreciará que las cifras del porcentaje de identidad superiores a las proporcionadas en el presente documento abarcarán realizaciones preferidas. Por tanto, cuando sea aplicable, a

la luz de las cifras de identidad mínimas de un porcentaje, se prefiere que el polipéptido/enzima comprenda una secuencia de aminoácidos que sea al menos el 40 %, más preferentemente al menos el 50%, más preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 65 %, más preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 91 %, más preferentemente al menos el 92 %, más preferentemente al menos el 93 %, más preferentemente al menos el 94 %, más preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 96 %, más preferentemente al menos el 97 %, más preferentemente al menos el 98 %, más preferentemente al menos el 99 %, más preferentemente al menos el 99,1 %, más preferentemente al menos el 99,2 %, más preferentemente al menos el 99,3 %, más preferentemente al menos el 99,4 %, más preferentemente al menos el 99,5 %, más preferentemente al menos el 99,6 %, más preferentemente al menos el 99,7 %, más preferentemente al menos 99,8 % e incluso más preferentemente al menos 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO. nominada relevante.

Los mutantes de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos definidos en el presente documento pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en un ácido nucleico definido en el presente documento, o mediante síntesis *in vitro* del polipéptido deseado. Dichos mutantes incluyen, por ejemplo, supresiones, inserciones y sustituciones de restos dentro de la secuencia de aminoácidos. Se puede realizar una combinación de deleciones, inserciones y sustituciones para llegar a la construcción final, siempre que el producto polipeptídico final posea las características deseadas.

Pueden prepararse polipéptidos mutantes (alterados) usando cualquier técnica conocida en este campo, por ejemplo, usando estrategias de evolución dirigida o de diseño racional (ver más abajo). Los productos derivados de ADN mutado/alterado pueden seleccionarse fácilmente utilizando técnicas descritas en el presente documento para determinar si poseen, por ejemplo, silenciando la actividad supresora.

Para diseñar mutantes de secuencias de aminoácidos, la localización del sitio de la mutación y la naturaleza de la mutación dependerán de la característica o características a modificar. Los sitios para la mutación pueden modificarse individualmente o en serie, por ejemplo, mediante (1) la sustitución en primer lugar con elecciones de aminoácidos conservativas y después con selecciones más radicales dependiendo de los resultados conseguidos, (2) delección del resto diana o (3) inserción de otros restos adyacentes al sitio localizado.

Las deleciones de la secuencia de aminoácidos generalmente varían de aproximadamente 1 a 15 restos, más preferentemente de aproximadamente 1 a 10 restos y normalmente de aproximadamente 1 a 5 restos contiguos.

Los mutantes de sustitución tienen al menos un resto de aminoácido en el polipéptido eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen sitios identificados como sitio o sitios activos. Otros sitios de interés son aquellos en los que los restos particulares obtenidos de diversas cepas o especies son idénticos. Estas posiciones pueden ser importantes para la actividad biológica. Estos sitios, especialmente aquellos incluidos dentro de una secuencia de al menos otros tres sitios idénticamente conservados, se sustituyen preferentemente de una manera relativamente conservadora. Dichas sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones ilustrativas".

En una realización preferida, un polipéptido mutante/variante tiene solo, o no más de, uno o dos o tres o cuatro cambios conservadores de aminoácidos en comparación con un polipéptido natural. En la Tabla 1 se proporcionan detalles de los cambios conservadores de aminoácidos. Como la persona experta sabrá, se puede predecir razonablemente que tales cambios menores no alterarán la actividad del polipéptido cuando se expresa en una célula recombinante. Además, la persona experta puede alinear fácilmente moléculas relacionadas, tales como las proteínas similares a V2 proporcionadas como SEQ ID NO: 1 y 38 a 51, para identificar variantes adecuadas basadas en aminoácidos conservados y no conservados.

Tabla 1. Sustituciones ejemplares.

| Resto original | Sustituciones ejemplares |
|----------------|--------------------------|
| Ala (A) | val; leu; ile; gly |
| Arg (R) | lys |
| Asn (N) | gln; his |
| Asp (D) | glu |
| Cys (C) | ser |
| Gln (Q) | asn; his |
| Glu (E) | asp |
| Gly (G) | pro, ala |
| His (H) | asn; gln |
| He (I) | leu; val; ala |
| Leu (L) | ile; val; met; ala; phe |
| Lys (K) | arg |
| Met (M) | leu; phe |

| | |
|---------|-------------------------|
| Phe (F) | leu; val; ala |
| Pro (P) | gly |
| Ser (S) | thr |
| Thr (T) | ser |
| Trp (W) | tyr |
| Tyr (Y) | trp; phe |
| Val (V) | ile; leu; met; phe, ala |

Evolución dirigida

5 En la evolución dirigida, la mutagénesis aleatoria se aplica a una proteína, y se usa un régimen de selección para seleccionar variantes que tengan las cualidades deseadas, por ejemplo, una mayor actividad supresora de silenciamiento. Luego se aplican rondas adicionales de mutación y selección. Una estrategia típica de evolución dirigida implica tres etapas:

10 1) *Diversificación*: El gen que codifica la proteína de interés se muta y/o recombina al azar para crear una gran biblioteca de variantes génicas. Las bibliotecas de genes variantes se pueden construir mediante PCR propensa a errores (véase, por ejemplo, Cadwell and Joyce, 1992), a partir de conjuntos de fragmentos digeridos con ADNasa I preparados a partir de moldes parentales (Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b; Cramer et al., 1998; Coco et al., 2001) a partir de oligonucleótidos degenerados (Ness et al., 2002, Coco, 2002) o de mezclas de ambos, o incluso de moldes parentales no digeridos (Zhao et al., 1998; Eggert et al., 2005; Jézéquel et al., 2008) y que habitualmente se ensamblan mediante PCR. Las bibliotecas también se pueden crear a partir de secuencias parentales recombinadas *in vivo* o *in vitro* mediante recombinación homóloga o no homóloga (Ostermeier et al., 1999; Volkov et al., 1999; Sieber et al., 2001). Las bibliotecas de genes variantes también pueden construirse subclonando un gen de interés en un vector adecuado, transformando el vector en una cepa "mutadora" tal como la cepa XL-1 red de *E. coli* (Stratagene) y propagando las bacterias transformadas durante un número adecuado de generaciones. Las bibliotecas de genes variantes también pueden construirse sometiendo el gen de interés a la combinación aleatoria de ADN (es decir, recombinación homóloga *in vitro* de grupos de genes mutantes seleccionados por fragmentación aleatoria y reensamblaje) como lo describe ampliamente Harayama (1998).

2) *Selección*: La biblioteca se prueba para detectar la presencia de mutantes (variantes) que posean la propiedad deseada utilizando examen o selección. El examen permite la identificación y el aislamiento de mutantes de alto rendimiento a mano, mientras que las selecciones eliminan automáticamente todos los mutantes no funcionales. Un examen puede involucrar el examen de la presencia de motivos de aminoácidos conservados conocidos. Como alternativa, o además, el examen puede implicar la expresión del polinucleótido mutado en un organismo hospedador o parte del mismo y analizar el nivel de actividad y, opcionalmente, expresar el polinucleótido original (no mutado). Como alternativa, el examen puede implicar alimentar el organismo o parte del mismo con sustrato marcado y determinar el nivel de sustrato o producto en el organismo o parte del mismo en relación con un organismo correspondiente o parte del mismo que carece del polinucleótido mutado y, opcionalmente, expresar el polinucleótido original (no mutado).

3) *Amplificación*: Las variantes identificadas en la selección o examen se replican muchas veces, lo que permite a los investigadores secuenciar su ADN para comprender qué mutaciones han ocurrido.

35 Conjuntamente, estas tres etapas se denominan una "ronda" de evolución dirigida. La mayoría de los experimentos implicarán más de una ronda. En estos experimentos, los "ganadores" de la ronda anterior se diversifican en la siguiente ronda para crear una nueva biblioteca. Al final del experimento, todas las proteínas o polinucleótidos mutantes desarrollados se caracterizan mediante métodos bioquímicos.

40 *Diseño racional*

Una proteína se puede diseñar racionalmente, basándose en la información conocida sobre la estructura y el plegamiento de la proteína. Esto se puede lograr mediante el diseño desde cero (diseño *de novo*) o por rediseño basado en andamios nativos (véase, por ejemplo, Halling, 1997; y Lu and Berry, Protein Structure Design and Engineering, Handbook of Proteins 2, 1153-1157 (2007)). El diseño de proteínas generalmente implica la identificación de secuencias que se pliegan en una estructura determinada o diana y se pueden lograr utilizando modelos informáticos. Los algoritmos computacionales de diseño de proteínas buscan secuencias en el espacio de conformación de secuencia que tengan poca energía cuando se pliegan a la estructura objetivo. Los algoritmos computacionales de diseño de proteínas utilizan modelos energéticos de proteínas para evaluar cómo afectarían las mutaciones a la estructura y función de una proteína. Estas funciones de energía generalmente incluyen una combinación de mecánica molecular, estadística (es decir, basada en el conocimiento) y otros términos empíricos. El software disponible adecuado incluye IPRO (rediseño y optimización intensivos de proteínas), EGAD (un algoritmo genético para el diseño de proteínas), Diseño de Rosetta, Sharpen y Abalone.

55 También se describen polipéptidos definidos en el presente documento que se modifican de manera diferencial durante o después de la síntesis, por ejemplo, por biotinylicación, por bencilación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a una

molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Estas modificaciones pueden servir para aumentar la estabilidad y/o bioactividad del polipéptido.

Usos

5 Las células de la invención con un mayor nivel de un ARN de interés y/o cantidad de proteína codificada por el ARN de interés, y un nivel reducido de ARN diana codificado por un primer polinucleótido de interés y/o cantidad de la proteína codificada por el ARN diana, pueden tener una amplia gama de propiedades deseadas que influyen, por ejemplo, en un rasgo agronómico, resistencia a insectos, resistencia a enfermedades, resistencia a herbicidas, esterilidad, características del grano y similares. Los ARN codificados pueden estar implicados en el metabolismo del aceite, almidón, hidratos de carbono, nutrientes, etc., o puede ser responsable de la síntesis de proteínas, péptidos, 10 ácidos grasos, lípidos, ceras, aceites, almidones, azúcares, hidratos de carbono, aromas, olores, toxinas, carotenoides, hormonas, polímeros, flavonoides, proteínas de almacenamiento, ácidos fenólicos, alcaloides, lignina, taninos, celulosas, glucoproteínas, glicolípidos, etc.

15 En un ejemplo particular, las plantas producían niveles aumentados de enzimas para la producción de aceite en plantas como *Brassica*, por ejemplo, aceite de colza o de girasol, cártamo, lino, algodón, soja o maíz; enzimas implicadas en la síntesis de almidón en plantas como la patata, el maíz y los cereales como el trigo, la cebada o el arroz; enzimas que sintetizan, o proteínas que son ellas mismas, medicamentos naturales, como productos farmacéuticos o productos veterinarios. 20

Los tipos de polipéptidos que se contemplan para la producción en una célula de la presente invención incluyen proteínas farmacéuticas para uso en mamíferos, incluyendo el hombre, tales como insulina, preproinsulina, proinsulina, glucagón, interferones tales como el interferón α y el -interferón γ , factores de coagulación de la sangre, tales como el 25 Factor VII, VIII, IX, X, XI y XII, hormonas de la fertilidad, tal como la hormona luteinizante, hormona estimulante del folículo, factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulador de colonias de granulocitos, prolactina, oxitocina, hormona estimulante tiroidea, hormona adrenocorticotrópica, calcitonina, la hormona paratiroidea, somatostatina, eritropoyetina (EPO), enzimas tales como la β -glucocerebrosidasa, hemoglobina, albúmina sérica, colágeno, hormona de crecimiento, seroalbúmina humana, 30 fosfatasa alcalina secretada humana, aprotinina, α 1-antitripsina, IgG1 (éster fosfonato), IgM (hapteno neuropéptido), SIgA/G (adhesina de (*Streptococcus mutans*), inmunotoxina scFv-briodina 1 (CD 40), IgG (HSV), LSC (HSV) y similares.

Además, las células de la invención se pueden usar para la producción de anticuerpos específicos, incluyendo moléculas relacionadas con anticuerpos o fragmentos activos de los mismos que se unen, por ejemplo, al receptor de 35 proteínas morfogenéticas óseas tipo IB; E16; STEAP1; MPF; Napi3b; Sema 5b; PSCA; Receptor de endotelina tipo B; MSG783; STEAP2; TrpM4; CRIPTO; CD21; CD79b; FcRH2; HER2; NCA; MDP; IL20R α ; Brevican; EphB2R; ASLG659; PSCA; GEDA; Receptor del factor de activación de linfocitos B; CD22; CD79a; CXCR5; HLA-DOB; P2X5; CD72; LY64; FcRH1; IRTA2; TENB2; CD20; VEGF incluyendo VEGF A, B, C o D; p53; EGFR; receptor de progesterona; catepsina D; Bcl-2; Cadherina E; CEA; Lewis X; Ki67; PCNA; CD3; CD4; CD5; CD7; CD11c; CD11d; c-Myc; tau; PrPSC; o A β . 40

Además, las células de la invención se pueden usar para la producción de un antígeno, que puede administrarse o no mediante el consumo del órgano de almacenamiento, ejemplos de los cuales incluyen la proteína de la envoltura del virus de la hepatitis B, glucoproteína G del virus de la rabia, enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*, proteína de la cápside del virus de Norwalk, autoantígeno de la diabetes, subunidad B de la toxina del cólera, subunidades B y A2 de la toxina del cólera, enterotoxina de rotavirus y fusiones del antígeno fimbrial enterotoxigénicos de *E. coli*, glicoproteína S del virus de la gastroenteritis transmisible porcina, rinovirus humano 15 (HRV-14) y epítomos del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1), epítomos del virus de la enteritis del visón, proteína estructural VP1 del virus de la fiebre aftosa, glicoproteína B, de citomegalovirus humano, antígenos de la caries dental (*S. mutans*) y antígenos del virus sincitial respiratorio. 50

En una realización, el ARN diana codifica un polipéptido distinto de una proteína que tiene actividad *sn*-2 glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y/o el ARN de interés codifica un polipéptido distinto de una proteína que tiene actividad monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT). En una realización, la célula eucariota es una célula distinta de una célula de *Arabidopsis thaliana*. 55

Ejemplos

60 **Ejemplo 1. Materiales y métodos generales**

Expresión de genes en células vegetales en un sistema de expresión transitoria

Los genes se expresaron en células vegetales usando un sistema de expresión transitoria esencialmente como se describe por Voinnet et al. (2003) y Wood et al. (2009). Los vectores binarios quiméricos, 35S:p19 y 35S:V2, para la expresión de los supresores del silenciamiento virales p19 y V2, respectivamente, se introdujeron por separado en la 65

cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101:mp90. Todos los demás vectores binarios que contienen una región de codificación para ser expresada por un promotor, como el promotor constitutivo fuerte CaMV 35S, se introdujeron en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. Las células recombinantes se cultivaron hasta la fase estacionaria a 28 °C en caldo LB suplementado con 50 mg/l de rifampicina y 50 mg/l de kanamicina u 80 mg/l de espectinomicina de acuerdo con el gen marcador seleccionable en el vector binario. Se añadió acetosiringona (100 µM) a los cultivos bacterianos y el crecimiento continuó otras 2 horas para la inducción de factores de virulencia. Las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 3000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de resuspender a OD600 = 2,0 en tampón de infiltración que contenía MES 10 mM, pH 5,7, MgCl 10 mM₂ y acetosiringona 100 µM. Las células se incubaron a continuación a 28 °C con agitación durante otros 30 minutos y se requirió un volumen de cada cultivo para alcanzar una concentración final de OD600 = 0,3 añadido a un tubo nuevo. Los cultivos mixtos que comprenden genes a expresar incluían cualquiera de las construcciones 35S: p19 o 35S: V2 en *Agrobacterium* a menos que se indique lo contrario. El volumen final se completó con el tampón de infiltración.

A continuación, las hojas se infiltraron con la mezcla de cultivo y las plantas se cultivaron normalmente durante otros tres a cinco días después de la infiltración antes de que se recuperaran los discos de las hojas para el aislamiento total de los lípidos. Se realizaron ciclos temporales de expresión de GFP en las hojas intactas desde el primer día después de la infiltración hasta los 7 días posteriores a la infiltración (dpi). Las plantas de *N. benthamiana* se cultivaron en armarios de crecimiento a una temperatura constante de 24 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 14/10 con una intensidad de luz de aproximadamente 200 lux usando iluminación fluorescente Osram 'Soft White' colocada directamente sobre las plantas. Normalmente, se usaron plantas de 6 semanas de edad para los experimentos y se infiltraron hojas verdaderas que se expandieron casi por completo. Todas las hojas no infiltradas se eliminaron por infiltración posterior para evitar el sombreado.

Análisis de lípidos

Aislamiento de lípidos totales y fraccionamiento

Las muestras de tejido se liofilizaron, se pesaron y los lípidos totales se extrajeron de muestras de aproximadamente 30 mg de peso seco, según lo descrito por Bligh y Dyer (1959). Cuando fue necesario, las fracciones de TAG se separaron de otros componentes lipídicos usando un sistema de cromatografía de capa fina (TLC) de 2 fases en placas de gel de sílice pre-recubiertas (Gel de sílice 60, Merck). Una muestra de lípidos extraída equivalente a 10 mg de peso seco del tejido de la hoja se cromatografió en una primera fase con hexano/éter dietílico (98/2 v/v) para eliminar las ceras no polares y después en una segunda fase utilizando hexano/éter dietílico/ácido acético (70/30/1 v/v/v). Cuando fue necesario, los lípidos polares se separaron de los lípidos no polares en muestras de lípidos extraídas de un equivalente de 5 mg de peso seco de hojas usando TLC bidimensional (gel de sílice 60, Merck), usando cloroformo/metanol/agua (65/25/4 v/v/v) para la primera dirección y cloroformo/metanol/NH₄OH/etilpropilamina (130/70/10/1 v/v/v/v) para la segunda dirección. Las manchas de lípidos, y los patrones apropiados que se analizan en las mismas placas de TLC, se visualizaron mediante una breve exposición al vapor de yodo, se recogieron en viales y se transmetilaron para producir FAME para el análisis GC de la siguiente manera.

Conversión de ácidos grasos en FAME

Para el análisis de lípidos totales, con la excepción del análisis del contenido de DHS, los lípidos extraídos de un equivalente de 10 mg de material de hoja de peso seco se transmetilaron usando una solución de metanol/HCl/diclorometano (10/1/1 v/v/v) a 80 °C durante 2 horas para producir ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Para el análisis de DHS en las hojas, las muestras se transmetilaron usando los mismos reactivos pero con condiciones más suaves, es decir, durante 10 minutos a 50 °C, usando DHS (Larodan Chemicals) como patrón de calibración. Los FAME se extrajeron en hexano, se concentraron hasta casi sequedad en una corriente de gas N₂ rápidamente se reconstituyeron en hexano antes del análisis por GC.

DHS y eDHS se determinaron en las muestras de lípidos totales mediante el siguiente método. Las muestras se trataron directamente con metóxido de sodio 0,1M en metanol/cloroformo (10:1) en un tubo de ensayo sellado con calentamiento a 90 °C durante 60 minutos para convertir los lípidos en FAME. Cuando se enfrió, la solución se acidificó ligeramente a pH 6-7 con ácido acético. Se añadieron solución salina y hexano/cloroformo (4:1 v/v) con agitación vigorosa, y la capa de hexano/cloroformo que contenía FAME se transfirió a un vial para análisis.

Cromatografía capilar de gas-líquido (GC)

Los FAME se analizaron por cromatografía de gases (GC) utilizando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N (Palo Alto, California, EE. UU.) equipado con una columna capilar de sílice fundida Equity™ -1 (15 m x 0,1 mm de diámetro interno, 0,1 µm de espesor de película), un FID, un inyector con división/sin división y un inyector y muestreador automático Agilent Technologies serie 7683. Se utilizó helio como gas portador. Las muestras se inyectaron en modo sin división a una temperatura del horno de 120 °C. Después de la inyección, la temperatura del horno se elevó hasta 201 °C a 10 °C.min⁻¹ y después a 270 °C a 5 °C.min⁻¹ y se mantuvo durante 20 min. Los picos se cuantificaron con el software Agilent Technologies ChemStation software (Rev B.03.01 (317), Palo Alto, California, EE. UU.). Las respuestas máximas fueron similares para los ácidos grasos del auténtico Nu-Check GLC patrón-411

(Nu-Check Prep Inc, MN, EE. UU.) que contenían proporciones iguales de 31 ésteres metílicos de ácidos grasos diferentes, incluyendo 18:1, 18:0, 20:0 y 22:0. Las ligeras variaciones de respuestas máximas entre picos se equilibraron multiplicando las áreas del pico por factores de normalización de cada pico. La proporción de cada ácido graso en los ácidos grasos totales de las muestras se calculó en función de las áreas de los picos individuales y totales para los ácidos grasos.

Análisis de FAME por cromatografía de gases - espectrometría de masas

El análisis de FAME por cromatografía de gases - espectrometría de masas (GCMS) se realizó usando un Varian 3800 equipado con una columna capilar BPX70 (longitud 30 m, d.i. 0,32 mm, espesor de película 0,25 µm, Phenomenex). Las inyecciones se realizaron en modo dividido usando helio como gas portador y una temperatura inicial de la columna de 60 °C, elevada a 20 °C.min⁻¹ hasta 180 °C, después elevada a 2,5 °C.min⁻¹ hasta 190 °C, después elevada a 25 °C.min⁻¹ hasta 260 °C y mantenida durante 2,2 min. Los espectros de masas se adquirieron bajo un impacto de electrones positivo en el modo de exploración completa entre 40 y 400 amu a una velocidad de 2 exploraciones por segundo utilizando un espectrómetro de masas Varian 1200 Single Quadrupole. Los espectros de masas correspondientes a cada pico en el cromatograma se compararon automáticamente con espectros de patrones puros. Se identificaron los espectros de prueba que coincidían con los espectros estándar con un alto grado de precisión y eluyeron al mismo tiempo que un patrón auténtico o eluyeron en un tiempo de retención plausible. Los FAME se cuantificaron mediante la integración del área de pico utilizando el software Varian y asumiendo factores de respuesta MS equivalentes en función del peso.

Cuantificación de TGA mediante latroscan

Se cargó un µl de cada extracto de hoja en un Chromarod-SII para TLC-FID latroscan™ (Mitsubishi Chemical Medience Corporation - Japón). El bastidor Chromarod se transfirió luego a un tanque de revelado equilibrado que contenía 70 ml de un sistema de disolventes Hexano/CHCl₃/2-Propanol/Ácido fórmico (85/10,716/0,567/0,0567 v/v/v/v). Después de 30 min de incubación, el bastidor Chromarod se secó durante 3 min a 100 °C y se exploró inmediatamente en un analizador latroscan MK-6s TLC-FID (Mitsubishi Chemical Medience Corporation - Japón). Las áreas del pico del patrón interno DAGE y TAG se integraron utilizando el software de integración SIC-480II (Versión: 7.0-E SIC System instruments Co., LTD - Japón).

La cuantificación de TAG se realizó en dos etapas. En primer lugar, se escaneó DAGE en todas las muestras para corregir los rendimientos de extracción, después de lo cual se seleccionaron y diluyeron muestras de TAG concentradas. A continuación, se cuantificó TAG en muestras diluidas con una segunda exploración de acuerdo con la calibración externa usando trilinoleato de glicerilo como patrón externo (Sigma-Aldrich).

Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Los vectores quiméricos que comprenden genes que se usan para transformar *Arabidopsis* se introdujeron en la cepa de *A. tumefaciens* AGL1 y las células del cultivo del *Agrobacterium* transformado se usaron para tratar las plantas de *A. thaliana* (ecotipo Columbia) utilizando el método de inmersión floral para la transformación (Clough and Bent, 1998).

Ejemplo 2. La proteína V2 actúa como un supresor del silenciamiento en ensayos de expresión transitoria

Construcción de genes quiméricos para la expresión de supresores del silenciamiento p19 o V2

La proteína p19 del virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV) (SEQ ID NO: 2) y la proteína V2 del virus del rizado amarillo de la hoja de tomate (TYLRV) (SEQ ID NO: 1) se han caracterizado como proteínas supresoras virales (VSP), que funcionan como supresores del silenciamiento (Voinnet et al., 2003; Glick et al., 2008). p19 se une a los ARNp de 21 nucleótidos de longitud antes de dirigir la escisión guiada por la proteína Argonauta del ARN homólogo (Ye et al., 2003). V2 es otro supresor del silenciamiento que interrumpe la función de la proteína vegetal SGS3, una proteína que se cree que está involucrada en la producción de intermedios de ARN de doble cadena a partir de sustratos de ARNcs (Elmayan et al., 1998; Mourrain et al., 2000; Beclin et al., 2002) ya sea uniéndose directamente a SGS3 (Glick et al., 2008) o uniéndose a intermedios de ARNdc que contienen una estructura 5' protuberante y excluyendo competitivamente a SGS3 de unirse a estos intermedios (Fukunaga y Doudna, 2009).

Se sintetizó químicamente una secuencia de ADN que codifica p19 (SEQ ID NO: 4), basada en la secuencia del genoma del virus del enanismo arbustivo del tomate (Hillman et al., 1989), que incluye un sitio NcoI que se abarca el codón ATG de inicio de la traducción. La secuencia de ADN se amplificó por PCR y se insertó en el vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen), produciendo un plásmido designado pCW087 (pENTR-p19). Se usaron a continuación las reacciones de la Gateway LR Clonase para introducir la secuencia de codificación de p19 en vectores binarios de plantas bajo el control del promotor CaMV35S, generando una construcción designada pCW195 (35S-p19), o el promotor de napina truncado FP1, generando pCW082 (FP1-p19). Además, el casete de expresión completo FP1-p19-ocs3' de pCW082 se amplificó por PCR con los sitios flanqueantes de Sacl y se ligó en pCW141, un vector de expresión de plantas que tiene un gen FP1-GFP como un marcador de semilla detectable/seleccionable, generando así un plásmido designado pCW164 (FP1-p19 y FP1-GFP). La presencia del gen FP1-GFP permitió la identificación y

selección no destructiva de semillas T1 transformadas en poblaciones mixtas cero/T1 que resultaron de las técnicas de inmersión utilizadas para transformar *Arabidopsis*.

Se sintetizó químicamente una secuencia de ADN que codifica V2 (SEQ ID NO: 3), basada en la secuencia del genoma del virus del rizado amarillo de la hoja de tomate (Glick et al., 2008), que incluía los sitios de restricción *NotI* y *Ascl* flanqueantes para permitir la clonación directa en el vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen), generando un plásmido designado pCW192 (pENTR-V2). Se usaron a continuación las reacciones de la Gateway LR Clonase para introducir el gen de V2 en vectores binarios de plantas bajo el control del promotor 35S (pCW197; 35S-V2) o para la expresión específica de semillas bajo el control del promotor de la napina truncado, FP1 (pCW195; FP1-V2).

El vector pUQ214 descrito en Brosnan et al. (2007) y que comprende un gen *35S-GFP*, se usó como ejemplo de un gen diana, que expresa GGP bajo el control del promotor 35S. Este vector binario incluía un gen marcador de resistencia a la kanamicina que puede usarse para la selección de células transformadas en plantas si se desea.

15 Función de los supresores en células vegetales

Para confirmar la función de las proteínas V2 y p19 como supresores del silenciamiento y, por lo tanto, de aumentar la expresión transgénica, las células de *Agrobacterium* que contenían cualquiera de las construcciones VSP dirigidas por 35S se infiltraron conjuntamente con células de *Agrobacterium* que contenían pUQ214 en hojas de *Nicotiana benthamiana* de la siguiente manera. Los transformantes de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que albergan cada vector binario por separado se cultivaron durante la noche a 28 °C en caldo LB suplementado con antibióticos (50 mg/l de kanamicina u 80 mg/l de espectinomicina, dependiendo del gen marcador seleccionable utilizado) y rifampicina. Los cultivos turbios se suplementaron con acetosiringona 100 µM y se cultivaron durante 2 horas más. Los cultivos se centrifugaron (4000xg durante 5 min a temperatura ambiente) para recolectar las células y los sedimentos celulares se resuspendieron suavemente en tampón de infiltración (5 mM MES, 5 mM MgSO₄, pH 5,7, acetosiringona 100 µM a una densidad óptica de aproximadamente 2,0. Se prepararon suspensiones celulares para infiltración, combinando diferentes transformantes según se requiera, de modo que cada cepa de *Agrobacterium* estaba presente a una DO_{600nm} de 0,3. Las suspensiones celulares se infiltraron en el envés de hojas completamente expandidas de 5-6 semanas de edad de plantas de *N. benthamiana* usando una jeringa de 1 ml sin aguja, usando una presión suave. Por estos medios, las suspensiones celulares entraron principalmente a través de los estomas e infiltraron la capa de células mesofílicas de las hojas. Las áreas infiltradas de las hojas, indicadas por la región empapada de agua y comúnmente de 3 a 4 cm de diámetro, fueron rodeadas por un marcador permanente. Las plantas se alojaron en una sala de crecimiento de plantas a 24 °C con ciclo de luz oscuridad de 14:10, donde la intensidad de la luz era 400-500 µEinstein.m⁻².s⁻¹ en la superficie de la hoja que recibía iluminación fluorescente superior (Philips TLD 35S/865 'Cold Daylight'). En estas condiciones, las *Agrobacteria* transfirieron eficientemente los ADN-T a las células de *N. benthamiana*.

La expresión de GFP en las hojas se midió diariamente de 1-7 días después de las infiltraciones midiendo la fluorescencia bajo luz UV. Las imágenes de GFP se capturaron en una cámara réflex digital (Nikon D60; lente 55-200 mm) utilizando la luz fluorescente NightSea y el juego de filtros (NightSea, Bedford, MA, Estados Unidos). Las hojas infiltradas generalmente se dejaron en la planta y se fotografiaron todos los días de 2-7 días después de la infiltración, por lo tanto, se pudo determinar la evolución temporal de la expresión de GFP para el mismo conjunto de infiltraciones. Las fotografías representativas de fluorescencia se muestran en la Figura 1.

La construcción 35S:GFP introducida en ausencia de una VSP produjo un nivel relativamente bajo de fluorescencia, indicativo de la expresión de GFP, con un pico después de 2-3 días y reduciéndose a partir de entonces. Por el contrario, Por el contrario, cuando la construcción GFP se infiltró conjuntamente con las construcciones supresoras p19 o V2, tanto la intensidad como la duración de la fluorescencia aumentaron considerablemente, extendiéndose y manteniéndose más allá de más de 7 días después de la infiltración. Estas observaciones indicaron una mayor expresión del gen *35S:GFP* en los ensayos en hoja en presencia de las VSP, y confirmó su función como proteínas supresoras potentes que inhibieron las vías de co-supresión endógenas en las células vegetales.

Medición de la expresión de GFP por análisis de transferencia Western

La expresión de GFP también se analizó mediante transferencia Western usando un anticuerpo específico de GFP como sigue. Se extrajo 1 cm² de hojas de las zonas infiltradas y se sometieron a extracción de proteínas desnaturizantes, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE; 12 % gel) y se transfirieron a una membrana de PVDF básicamente como se describe (Helliwell et al., 2006). La proteína GFP se detectó usando un anticuerpo monoclonal anti-GFP (dilución 1:10000, Clontech) y anti-ratón de cabra-HRP (dilución 1:5000, Promega) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se usó la tinción con azul de Coomassie de proteínas de alto peso molecular que permanecen en los geles después de la transferencia a membranas de PVDF para confirmar la misma carga de proteína entre las muestras. El tamaño de la proteína se determinó usando la Escala de proteína PageRuler pre-teñida (MBI-Fermentas P7711S).

Los resultados de los análisis de transferencia Western confirmaron los datos de fluorescencia, confirmando la función de p19 y V2 como supresores del silenciamiento (Figura 2).

Ejemplo 3. El silenciamiento del gen del ARNi puede producirse simultáneamente con la supresión del silenciamiento

5 Construcciones de ARNi de horquilla dirigidas a GFP

Se usó una construcción binaria pUQ218 (Brosnan et al., 2007), que contenía un gen *35S-GFP* y una región que codifica la horquilla 35S dirigida a GFP y dentro de la misma región del ADN-T, cuando los experimentos usaban tanto la expresión de GFP como las actividades simultáneas de silenciamiento de GFP en la misma célula. La horquilla de
 10 ARN comprendía los primeros 380 pb de la secuencia que codifica GFP, lo que corresponde a los nucleótidos 1 a 380 con N.º de registro.U43284. Se generó una construcción binaria hpGFP sin el gen 35S-GFP eliminando el componente 35S-GFP mediante una reacción de digestión/religamiento con *NheI-AvrII*, creando pCW445 (35S-hpGFP).

15 Coexpresión de supresores del silenciamiento y construcciones de silenciamiento con expresión transgénica

Las VSP, V2 y p19, se compararon en combinación con la expresión de GFP del gen *35S-GFP* y una horquilla dirigida a GFP (hpGFP) para silenciar el gen *35S-GFP*, usando ensayos de expresión transitoria de los genes de *Agrobacterium* en hojas de *N. benthamiana*. Estos se compararon con las infiltraciones de control sin la hpGFP, en puntos adyacentes en la misma hoja al mismo tiempo, para determinar los niveles de expresión en ausencia del ARN en horquilla. La figura 1, panel B, muestra fotografías representativas de la fluorescencia observada de 2 a 7 días después de la infiltración. La combinación de pCW195 (35S-p19) y pUQ218 (que contiene GFP y hpGFP) dio como resultado altos niveles de expresión de GFP, lo que indica que p19 efectivamente suprimió el silenciamiento mediante el ARN en horquilla del transgen GFP. Por el contrario, las combinaciones de V2, 35S-GFP y hpGFP dieron lugar a un silenciamiento casi total de GFP. El silenciamiento completo de GFP se logró con hpGFP en ausencia de cualquier
 20 VSP.

Los experimentos usando pUQ218 generaron resultados equivalentes para la expresión de GFP en comparación con la combinación de vectores independientes pUQ214 (35S-GFP) y pCW557 (35S-hpGFP). Esto indicó que la construcción de ARN en horquilla se introdujo eficientemente en las células a través de *Agrobacterium* en los experimentos descritos anteriormente, y que no era necesario unir el gen diana y el gen silenciador en una sola construcción en los ensayos de expresión transitoria en hojas.

Las transferencias Western de los niveles de proteína GFP (Figura 2) usando un anticuerpo específico como en el Ejemplo 2 confirmaron que la coinroducción de p19 suprimió la actividad silenciadora de hpGFP, permitiendo así una potente expresión de GFP. Por el contrario, solo se detectó un bajo nivel de expresión de GFP cuando se introdujo la combinación de V2, GFP e hpGFP. Esta gran diferencia entre p19 y V2 con respecto a la supresión de la función de un ARN en horquilla indicó que V2 puede permitir una potente sobreexpresión de transgenes simultáneamente con estrategias de ARNi basadas en horquilla en la misma célula.

40 **Ejemplo 4. Silenciamiento de un gen endógeno en la presencia de supresores del silenciamiento**

Para probar si un gen endógeno podría silenciarse simultáneamente con la expresión de un supresor del silenciamiento, se diseñó y construyó una construcción de ARN en horquilla que silenciaría un gen *FAD2* en plantas de *N. benthamiana* (*NbFAD2*) (SEQ ID NO: 11). *FAD2* es una enzima unida a la membrana localizada en el retículo endoplasmático (ER) que desatura la fosfatidilcolina esterificada 18:1 (18: 1-PC) para formar 18:2-PC. La actividad de *FAD2* se puede analizar fácilmente analizando la composición de lípidos de ácidos grasos en los tejidos vegetales y determinando la proporción entre 18:1 (ácido oleico) y 18:2 (ácido linoleico) en los ácidos grasos totales. *FAD2* es activa en hojas de *N. benthamiana* como en otras plantas, dando lugar a bajos niveles de 18:1-PC en las hojas. Como la 18:1-PC es un metabolito importante para una variedad de vías metabólicas alternativas de ácidos grasos, se creó un gen quimérico que incluía una repetición invertida de una región de 660 pares de bases de *NbFAD2* (SEQ ID NO: 12), correspondiente a la porción central del transcrito de 1151 pb endógeno, para silenciar *NbFAD2* como sigue.

Construcción de la construcción de horquilla dirigida a NbFAD2

Se generó un fragmento de 660 pb de *NbFAD2* por RT-PCR a partir de ARN total de hoja usando cebadores diseñados contra las regiones conservadas de una secuencia de *Nicotianum tabacum* *FAD2* en la base de datos Solgenomics (SGN-U427167), concretamente el cebador directo NbFAD2F1 5'-TCATTGCGCACGAATGTGGCCACCAT-3' (coordenadas +451 pb) (SEQ ID NO: 13) y el cebador inverso NbFAD2R1 5'-CGAGAACAGATGGTGCACGACG-3' (coordenadas +1112 pb) (SEQ ID NO: 14). El ARN total se aisló de hojas jóvenes de *N. benthamiana* utilizando un método a base de Trizol (Invitrogen y bibliografía asociada). Se realizó una reacción con el kit Platinum Taq One-Step RT-PCR (Invitrogen) utilizando las condiciones de ciclización de 50 °C(10 min), 94 °C(2 min) y 30 ciclos de 50 °C (30 s)/72 °C(60 s)/92 °C(30s) y un ciclo final de 72 °C (2 min). El fragmento del gen *NbFAD2* se ligó posteriormente en pENTR11 y se recombinó usando los procedimientos de Gateway estándar en el vector pHellgate8 (Helliwell et al., 2002) para generar el plásmido designado pFN033. Esta construcción tenía una repetición invertida del fragmento de 660pb bajo el control del promotor 35S, produciéndose de este modo, tras la transcripción, una horquilla de ARN dirigida contra *NbFAD2*, denominada en lo sucesivo hpNbFAD2.

hpNbFAD2 se transformó en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 y se infiltró en hojas de *N. benthamiana* en combinación con Agrobacteria que contenía las construcciones 35S:V2 o 35S:p19. Cinco días después de la infiltración, se tomaron muestras de las zonas infiltradas de las hojas, se extrajeron los lípidos totales y se analizó la fracción de PC. El análisis de ácidos grasos de la fracción de PC de las hojas infiltradas con combinaciones de hpNbFAD2 y V2 mostró un aumento sustancial en el contenido de 18:1-PC desde el 9 % de 18:1-PC hasta el 39 % de 18:1-PC (Figura 3). Estos porcentajes se basaron en las cantidades observadas de 18:1, 18:2 y 18:3 encontradas en la fracción de PC y expresadas como un porcentaje de la suma de estos tres ácidos grasos. En comparación, la combinación de p19 y hpNbFAD2 tuvo como resultado un silenciamiento parcial de la actividad de FAD2, reflejado en un incremento desde el 8 % de 18:1-PC hasta el 25 % de 18:1-PC, un resultado que indica que hpNbFAD2 podría silenciar el gen *FAD2* endógeno en un grado moderado en presencia de coexpresión de p19. Trabajos previos han demostrado que las células foliares infiltradas con una combinación de cepas de Agrobacteria, conteniendo cada una un vector separado, recibieron al menos una o más copias de ADN-T de cada vector (Wood et al., 2009). Esto nos aseguró que la gran mayoría de las células en los ensayos de hojas descritos anteriormente habían recibido y expresado tanto la horquilla como los genes codificadores supresores.

El aumento de los niveles de 18:1-PC se reflejaba en una reducción del contenido de 18:2-PC en las células. Por el contrario, los niveles de 18:3-PC eran prácticamente los mismos, presumiblemente debido a la gran cantidad de 18:3 generada en las vías independientes de FAD2 que se encuentran en los cloroplastos de las hojas.

Para establecer que las construcciones supresora y horquilla se introdujeron en las mismas células de manera eficiente, también se crearon y probaron construcciones que co-localizaban los genes dentro de las mismas construcciones de ADN-T, generando así ADN-T individuales con combinaciones de genes 35S-p19+35S-hpNbFAD2 y 35S-V2+35S-NbFAD2. La región 35S-p19-ocs3' completa de pCW194 se amplificó por PCR usando los cebadores incluyendo los sitios flanqueantes *MluI*, (subrayado) concretamente el cebador directo 5' aaccgcttcgacgaattaattccaatcccaca-3' (SEQ ID NO: 15) y el cebador inverso OCS'3 5'-ACGCGTCTGCTGAGCCTC-GACATGTT-3' (SEQ ID NO: 16). El fragmento amplificado se ligó al sitio único *MluI* dentro de pFN033 para crear pCW701, que contiene 35S-p19+35S-hpNbFAD2. Utilizando los mismos cebadores, la región 35S-V2-ocs3' completa de pCW197 se amplificó por PCR y este amplicón se ligó en el sitio único *MluI* de pFN033 para crear pCW702, que contiene 35S-p19+35S-hpNbFAD2. Estos vectores que tienen los genes codificadores de supresor y horquilla localizados dentro de la misma región de ADN-T se transformaron en la cepa de *Agrobacterium* AGL1 y se infiltraron en las hojas de *N. benthamiana* como antes. Se tomaron muestras de los tejidos foliares a 5 dpi y se analizaron las fracciones lipídicas de PC para los niveles 18:1, 18:2 y 18:3. Los resultados fueron indistinguibles en comparación con los resultados obtenidos usando genes introducidos en vectores separados, los inventores concluyeron que esencialmente todas las células foliares transformables en ensayos de expresión transitoria en hojas recibieron al menos una copia de cada ADN-T en las mezclas de infiltración.

Silenciamiento simultáneo de un gen a la vez que se sobreexpresa un segundo gen

Para probar si se podrían sobreexpresar genes adicionales con la ayuda de un supresor del silenciamiento mientras se silencia el gen *FAD2* endógeno, se crearon construcciones adicionales para la sobreexpresión de genes que codifican DGAT1 y oleosina en células vegetales. Todas las células vegetales poseen vías lipídicas activas que producen clases de lípidos como DAG y acil-CoA (Ohlrogge y Browse, 1995), sin embargo, la esterificación de estos sustratos a través de DGAT para producir TAG solo ocurre a niveles significativos en órganos especializados, como semillas oleaginosas y polen. Se ha demostrado que la expresión ectópica de AtDGAT1 en las hojas genera mayores niveles de aceites (Bouvier-Nave et al., 2000). Estudios anteriores también han demostrado que AtDGAT1 tiene cierta especificidad de sustrato por 18:1 y su producto de alargamiento, 20:1 (Katavic et al., 1995). Las oleosinas son proteínas anfipáticas cuyas propiedades sitúan a estas proteínas en las interfaces aceite/hidrófilas, creando así un recubrimiento que rodea las gotas de aceite y formando los llamados 'cuerpos oleosos' en los tejidos generadores de aceite (Tzen et al., 1992). Los 'cuerpos oleosos' se consideran un orgánulo de almacenamiento a largo plazo ya que la capa de oleosina protege al TAG de procesos catabólicos como las TAG lipasas. Las semillas de *Arabidopsis* mutantes que carecen de una oleosina funcional, *ole1*, tienen un contenido significativamente reducido de 18:1 y este contenido de 18:1 se restauraba tras la expresión ectópica de un gen que codifica oleosina de sésamo (Scott et al., 2010).

Síntesis y uso de construcciones para sobreexpresar DGAT1 y oleosina

La región codificante del gen *AtDGAT1* (SEQ ID NO: 10) se clonó a partir del ARNm de *Arabidopsis* Col-0 recogida de embriones en desarrollo utilizando cebadores basados en el N.º de registro NG_127503. El amplicón se clonó en pENTR11 (Invitrogen) y se recombinó mediante una reacción de LR clonasa en un vector de expresión binario 35S para crear 35S-*AtDGAT1*. La construcción de oleosina se usó como se describe por Scott et al. (2010). Esta construcción tenía un promotor 35S que dirigía una región codificante de oleosina (SEQ ID NO: 6) aislada del sésamo, que codificaba la proteína con la secuencia de aminoácidos con N.º de registro AF091840 SEQ ID NO: 5, generando la construcción designada 35S-oleosina.

Se probaron combinaciones de cepas de agrobacterias que contienen vectores por separado para la transferencia de

genes que codifican DGAT1, oleosina y p19 o V2 y además hpNbFAD2 en hojas de *N. benthamiana* y se analizó el contenido de aceite y la composición de ácidos grasos en los tejidos infiltrados. Las muestras de hojas se retiraron 5 dpi y se liofilizaron durante la noche. Los lípidos se extrajeron de muestras de aproximadamente 30 mg de peso seco utilizando el método de Bligh y Dyer (1959). Los TAG en los lípidos extraídos se separaron de los lípidos polares usando un sistema de TLC de 2 fases en placas de gel de sílice pre-recubiertas (gel de sílice 60, Merck). Primero se procesó una muestra de lípidos equivalente a 10 mg de peso seco del tejido de la hoja con hexano/éter dietílico (98/2 por vol.) para eliminar ceras no muy polares y se realizó una segunda ronda utilizando hexano/éter dietílico/ácido acético (70/30/1 en vol.). Las manchas de lípidos y los patrones apropiados, se visualizaron mediante breves exposiciones al vapor de yodo, se recogieron en viales y se transmetilaron para producir FAME para el análisis GC como se describe en el Ejemplo 1. Los datos se muestran en la Figura 4.

Las hojas infiltradas con los genes que codifican V2 y tanto DGAT1 como oleosina tuvieron un aumento de aproximadamente 5 a 6 veces en el contenido de TAG. Además, hubo una duplicación del nivel de 18:1 calculado como un porcentaje de los ácidos grasos totales en la fracción TAG, lo que indica que la combinación de estos dos genes en presencia del supresor del silenciamiento mejoró la formación (síntesis y acumulación) de aceites foliares con niveles elevados de ácido oleico. La posterior adición de la construcción de silenciamiento hpNbFAD2 aumentó el nivel de 18:1 en el aceite foliar hasta el 44 % cuando se usaba V2 o hasta el 35 % usando p19 como la VSP. Esta configuración de ensayo confirmó que tanto V2 como p19 permitían la sobreexpresión de transgenes, codificando, por ejemplo, AtDGAT1 y oleosina. Aunque ambos supresores de silenciamiento permitieron un silenciamiento de FAD2 endógeno simultáneo efectivo, el uso de V2 proporcionó un mayor grado de silenciamiento que p19. A partir de la eficiencia de la acumulación de 18:1 en los TAG, estas observaciones fueron consistentes con la conclusión anterior de que la sobreexpresión de los transgenes facilitada por las VSP estaba ocurriendo simultáneamente en las mismas células que el silenciamiento de FAD2.

En otro experimento realizado para demostrar que genes adicionales podrían sobreexpresarse con la ayuda de un supresor del silenciamiento mientras se reduce simultáneamente la expresión de un segundo gen con un ARN en horquilla, se realizó una construcción para expresar una enzima FAE1 (SEQ ID NO: 7). FAE1 es una enzima que alarga los ácidos grasos saturados y monoinsaturados esterificados con CoA mediante la adición de 2 carbonos a la cadena de acilo en el extremo carboxilo de la molécula de ácido graso (James et al., 1995). Estudios previos han demostrado que la expresión ectópica de *AtFAE1* tuvo como resultado la producción de una variedad de nuevos ácidos grasos elongados, que incluyen una serie de los llamados ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) debido a la actividad secuencial de *AtFAE1* en ciclos de elongación. La enzima usa sustratos de acil-CoA (Millar et al., 1998).

Síntesis de la construcción para expresar FAE1

La región codificante de *AtFAE1*, Número de registro TAIR 2139599, se sintetizó químicamente, se subclonó en pGEMT-Easy y se subclonó mediante los sitios flanqueantes de EcoRI en el vector de clonación pENTR, pCW306, para incluir los sitios *AttL1* y *AttL2*, para generar pCW327. Un intrón de la catalasa-1, del gen de la catalasa-1 de semilla de ricino, se ligó en el sitio único *NotI* justo corriente arriba del ORF de *AtFAE1* para generar pCW465, pENTR-intrón-*AtFAE1*. Se usaron las reacciones de LR clonasa para recombinar el fragmento intrón-*AtFAE1* (SEQ ID NO: 8) en un vector de expresión 35S, generando pCW483 (35S-intrón-*AtFAE1*). pCW483 se transformó en la cepa de *Agrobacterium* AGL1 y se expresó transitoriamente en las hojas de *N. benthamiana* igual que antes en combinación con los otros genes. Se encontró una amplia variedad de productos de elongación en hojas que expresan *AtFAE1*, incluido un número significativo de VLCFA tal como 20:1 (Figura 11). En base a la especificidad de sustrato conocida de *AtFAE1*, concluimos que 18:1-CoA sería un sustrato preferido para *AtFAE1*, sin embargo, este sustrato solo se encontraría en hojas de tipo silvestre a niveles bajos debido a la actividad de *NbFAD2*. Por lo tanto, los inventores combinaron la sobreexpresión de *AtFAE1* con el silenciamiento basado en horquilla de *NbFAD2* en presencia del supresor del silenciamiento V2.

Estos experimentos demostraron que los supresores del silenciamiento como V2 permitían la sobreexpresión de transgenes y el silenciamiento simultáneo de genes endógenos en la misma célula, y permitían formar un conjunto de sustrato optimizado para la ingeniería metabólica de ácidos grasos, p.ej. 20:1 y otros VLCFA.

Ejemplo 5. Análisis del ARN pequeño del silenciamiento basado en horquilla de un endógeno

Se sabe que las construcciones de ARNi basadas en horquilla generan poblaciones de ARN pequeño homólogo a la horquilla, generalmente conocidas como moléculas de ARNp primario. Estos ARNp primarios pueden desencadenar la producción de ARNp secundarios que son homólogos a regiones en el ARN diana fuera de la región diana de horquilla. Tales ARNp son en su mayoría de 21, 22 o 24 nucleótidos de longitud, lo que refleja su biogénesis a través de varias vías que utilizan diferentes proteínas Dicer. Cada longitud puede tener funciones específicas en el silenciamiento génico transcripcional (TGS) y el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS). Con la disponibilidad de tecnologías de secuenciación profunda, los inventores investigaron las poblaciones de ARN pequeño que surgen del silenciamiento génico basado en horquillas del gen *NbFAD2* endógeno por hpNbFAD2 en los ensayos de expresión transitoria, como anteriormente.

Clonación del marco de lectura abierto de longitud completa del gen NbFAD2

Primero de todo, el marco de lectura abierto de longitud completa del gen *FAD2* de *N. benthamiana* se secuenció de la siguiente manera. El ADN genómico se aisló de 20 g de peso fresco de hojas de *N. benthamiana* utilizando un método que reducía la contaminación con ADN cloroplástico y mitocondrial (Peterson et al., 1997). El ADN de alto peso molecular se cortó aleatoriamente en fragmentos de aproximadamente 500 pb y se ligó con adaptadores de biblioteca TruSeq para generar una biblioteca de ADNg. Esta biblioteca fue secuenciada en la plataforma HiSeq2000 en una celda de flujo completa. Se conservaron secuencias de alta calidad para generar una alineación contra el fragmento hpNbFAD2 de 660 pb (pFN033) usando el software BowTie. La región codificante de longitud completa de NbFAD2 se clonó posteriormente mediante PCR de alta fidelidad usando los cebadores Directo 5'-TTTATGGGAGCTGGTGGTAATAT- GT-3' (SEQ ID NO: 17) e Inverso 5'-CCCTCAGAATTTGTTTTGTACCAGAAA-3' (SEQ ID NO: 18) (codones de inicio y parada subrayados) y la secuencia se verificó usando técnicas de secuenciación BigDye3.1.

Análisis del ARN pequeño

A continuación, se utilizaron métodos de secuenciación profunda para analizar las poblaciones de ARNp generadas a partir de la construcción de silenciamiento de ARNi en horquilla, hpNbFAD2, en hojas coinfiltradas con la construcción que codifica V2. El ARN total se aisló de las hojas a 5 dpi utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los ARN pequeños (rango de tamaño de 15-40 nt) se purificaron mediante electroforesis en gel y se analizaron en una máquina Illumina GAXII de acuerdo con los protocolos del fabricante.

Los ARN pequeños que tienen una secuencia con identidad con el gen *NbFAD2* fueron identificados y cotejados. Las clases de tamaño de ARNp predominantes observadas (20-24 nt) mostraron una distribución no uniforme entre las cadenas directa e inversa de la secuencia diana de 660 pb (Figura 8). Las alineaciones de las lecturas de ARN pequeño contra la secuencia del marco de lectura abierto de *NbFAD2* de longitud completa indicaban que todos los ARNp observados con homología con *NbFAD2* tenían identidad con la región utilizada para generar la construcción de horquilla, y ninguna con las regiones no diana. Por lo tanto, concluimos que la combinación del supresor del silenciamiento V2 y hpNbFAD2 no generaba ARNp secundarios a una frecuencia observable. Los números absolutos de las clases de tamaño de ARNp mostraron que los ARNp de 20, 21, 22, 23 y 24 nt representaban el 10 %, 44 %, 36 %, 4 % y 10 % de todos los ARNp, respectivamente (Figura 9). Este resultado confirmó que las horquillas generaron ARNp primarios contra un gen endógeno y no ARNp secundarios, aunque no pudimos excluir una influencia del supresor V2 en este resultado.

Ejemplo 6. Manipulación de una ruta transgénica para la síntesis de ácidos grasos ciclopropanados en el tejido foliar

El ácido oleico en la fracción PC también es el punto de partida para rutas metabólicas alternativas, y por lo tanto, se investigó una ruta metabólica alternativa que usa ácido oleico como sustrato como un sistema para comparar diferentes actividades de VSP en ensayos de expresión transitoria en hojas. Se eligió el ácido dihidroestercúlico (DHS) como el producto deseado del ácido oleico. El DHS es un ácido graso ciclopropanado que es producido por las ciclopropano ácido graso sintetasas (CPFAS) usando 18:1-PC como sustrato (Figura 5). Se compararon dos genes CPFAS diferentes (Figura 6) en cuanto a su actividad en ensayos de hojas para producir DHS, concretamente el CPFAS de *Escherichia coli* (EcCPFAS) (SEQ ID NO: 24) y el dominio C-terminal del CPFAS del algodón (SEQ ID NO: 21), en lo sucesivo denominado GhCPFAS*, utilizando ensayos de hojas en combinación con genes que codifican V2, hpNbFAD2, DGAT1 y oleosina.

Construcción de genes para la sobreexpresión de EcCPFAS y GhCPFAS* para la expresión transitoria en hojas y semillas

Se sintetizó químicamente una secuencia de ADN que codifica una enzima CPFAS de *Escherichia coli*, basada en el N.º de registro AE000261.1 desde el nucleótido 6129 para una longitud de 1143pb, SEQ ID NO: 26). La proteína codificada tenía la misma secuencia de aminoácidos que la proteína de *E. coli*, aunque la secuencia de nucleótidos tenía codones optimizados con un sesgo de codón más adecuado para la expresión eucariota. El fragmento de codificación EcCPFAS se clonó en el sitio *EcoRI* de pCW391, generando pCW392, una construcción binaria de ADN-T útil para ensayos de hojas (35S-EcCPFAS).

GhCPFAS*

El primer gen CPFAS de la planta que se aisló y caracterizó en sistemas de expresión heterólogos, concretamente *SfCPFAS* de *Sterculia foetida*, se vio que poseía una porción C-terminal de la enzima con excelente homología con enzimas CPFAS bacterianas conocidas y una región N-terminal con motivos con homología con oxidasas de unión a FAD (Bao et al., 2002). Un estudio ha encontrado que *SfCPFAS* es inusual y diferente a otras enzimas modificadoras de ácidos grasos vegetales al actuar sobre 18:1 esterificada en la posición sn1 de la fosfatidilcolina (PC) (Bao et al., 2003).

El gen *CPFAS-1* del algodón muestra cierta homología con el gen *SfCPFAS* y la expresión de *GhCPFAS-1* de longitud

completa en cultivos de células BY2 de tabaco tuvo igualmente como resultado aproximadamente 1 % de DHS (Yu et al., 2011). La expresión de *GhCPFAS-1* de longitud completa en semillas con constitución mutante de *fad2 fae1* de *Arabidopsis*, con niveles elevados de ácido oleico en las semillas, también generó aproximadamente 1% de DHS (Yu et al., 2011). En una comparación del GhCPFAS de longitud completa para producir DHS y una proteína truncada en los primeros 409 aminoácidos, eliminando así el dominio de oxidasa de unión a FAD, se observó que la eliminación de los primeros 409 aminoácidos redujo la producción de DHS en levaduras en aproximadamente un 70% (Yu et al., 2011). En general, estos resultados indicaron que las enzimas CPFAS de la planta eran capaces de producir un bajo nivel de DHS en los sistemas de expresión transgénicos, pero que los primeros 409 aminoácidos eran necesarios para una actividad máxima. Sin embargo, como se describe a continuación, los presentes inventores se sorprendieron al encontrar que en las células vegetales las enzimas truncadas tenían una actividad de CPFAS mejorada.

Se generó un fragmento de ADN que codifica los 469 aminoácidos C-terminales de la enzima GhCPFAS-1 de longitud completa, comenzando en la posición de nucleótido 1248 con respecto a la secuencia de N.º de registro AY574036 y usando un ATG interno en el marco como el nuevo codón de inicio, en reacciones de RT-PCR usando ARN total aislado de algodón, para generar una secuencia de nucleótidos que codifica (SEQ ID NO: 23) la proteína modificada GhCPFAS * (SEQ ID NO: 21). La longitud prevista de la proteína fue de 469 aminoácidos y, por lo tanto, incluyó solo la región con homología con el gen bacteriano CPFAS, sin que la región N-terminal tuviera homología con las oxidasas de unión a FAD. Los cebadores de PCR utilizados para amplificar esta región de *Gh-CPFAS-1* incluían los sitios flanqueantes Spel (subrayados) y eran el cebador directo: 5'-TTACTAGTATGGATGCTGCACAT- GGTATCT-3' (SEQ ID NO: 19) y el cebador inverso: 5'- TTACTAGTTCAATCATCCATGAAGGAATATGCAGAA-3' (SEQ ID NO: 20). El amplicón se insertó en el sitio Spel de 35S-pORE4 para generar pCW618 (35S-GhCPFAS*).

La construcción se introdujo en *Agrobacterium* y se usó para infiltrar hojas de *N. benthamiana* en ensayos de expresión transitoria de hojas, como anteriormente, en varias combinaciones con otros genes. Los análisis del contenido total de lípidos de las zonas infiltradas de estas hojas indicaron que GhCPFAS * produjo eficientemente DHS en las hojas (Figura 6). El nivel de DHS producido en presencia de GhCPFAS * fue aproximadamente un 7 % del total de ácidos grasos en los lípidos de las hojas, con una eficiencia de conversión de la vía general del 47 % para la conversión de ácido oleico en DHS. En comparación, EcCPFAS produjo menos del 1 % de DHS en ácidos grasos totales en los lípidos de las hojas con una eficiencia de conversión del 4 %. Por lo tanto, durante el resto de este estudio se utilizó GhCPFAS *.

En un experimento adicional, la producción de DHS por GhCPFAS* se utilizó para comparar directamente la eficiencia de p19 o V2 para ayudar a la sobreexpresión simultánea del transgén GhCPFAS * y el silenciamiento del gen *NbFAD2*, es decir, donde se requería el silenciamiento de un gen endógeno para maximizar el flujo en una nueva vía biosintética. Se infiltraron varias combinaciones de GhCPFAS*, DGAT1, oleosina, V2, p19, y hpNbFAD2 en hojas de *N. benthamiana* y se determinó la producción de DHS (Figura 7). En ausencia de hpNbFAD2, se observó un nivel ligeramente mayor de producción de DHS en presencia de p19 en comparación con V2. Sin embargo, en presencia de la horquilla hpNbFAD2, se observaron niveles mayores de DHS con el uso de V2. V2 permitió que se produjeran los mayores niveles de sustrato (18:1) y también los mayores niveles de producción de DHS. En general, el uso de V2 en el escenario combinado de sobreexpresión y silenciamiento generó aproximadamente un 30 % más de DHS en los ensayos de hojas en comparación con el uso de p19.

Una etapa crítica en las rutas de síntesis de TAG implica la eliminación del grupo acilo del grupo principal de PC en las reservas de CoA. Una vez que los grupos acilo entran en las reservas de CoA, están disponibles para la ruta de síntesis de TAG denominada ruta 'Kennedy' que incluye el último paso comprometido de la formación de TAG catalizada por la enzima DGAT. El movimiento de DHS, producido en la fracción de PC de las hojas, en los TAG de las hojas se probó combinando GhCPFAS* con DGAT1, oleosina y hpNbFAD2 (Figura 10). El DHS producido por GhCPFAS*, DGAT1 y la oleosina se encontraron en los TAG foliares en aproximadamente un 7 % del contenido total de ácidos grasos en TAG, con una eficiencia de conversión de ácido oleico a DHS de 55 %. La inclusión de hpNbFAD2 aumentó el porcentaje de DHS en TAG de hoja del 7 % al 15 %, mientras que la eficiencia de conversión se mantuvo sin cambios en el 55 %. Estos resultados indicaban que la combinación de V2 y hpNbFAD2 duplicó el flujo de DHS en la vía metabólica, utilizando además CPFAS* + AtDGAT1 + oleosina, para producir aceites vegetales que tienen mayores concentraciones de ácidos grasos ciclopropanables.

Para demostrar si el DHS se intercambiaba fácilmente entre los grupos de PC y CoA, se realizó un experimento adicional que agregó AtFAE1 a la combinación de enzimas. Los inventores razonaron que el ácido graso DHS, que contiene un anillo de propano de cadena media, era probable que formara una estructura similar e intermedia entre la de un ácido graso C18 saturado y uno monoinsaturado y que si el DHS se transfería de la fracción de PC al conjunto de CoA, sería un sustrato adecuado para AtFAE1 para producir DHS elongado (eDHS). Para examinar si el DHS, producido en PC, se transfería al conjunto de CoA de hojas, se incluyó el gen 35S:*AtFAE1* quimérico en combinación con genes que codifican V2, GhCPFAS* y hpNbFAD2, cada uno bajo el control del promotor 35S. Los resultados del análisis de ácidos grasos se muestran en la Figura 11. Los lípidos totales analizados a 5 dpi se enriquecieron para DHS y un nuevo metabolito. El nuevo metabolito se confirmó como eDHS, un producto elongado de DHS con 2 átomos de carbono adicionales, mediante el uso de técnicas estándar de GC/MS (Figura 12). La eficiencia de conversión de DHS a eDHS fue de un promedio del 15 % en 6 muestras en comparación con la conversión de 18:1 a 20:1 que fue de un promedio del 28 %. En conjunto, estos experimentos proporcionaron evidencia de que el DHS producido en la

PC se trasladó eficientemente al conjunto de CoA y se acumuló en los aceites de las hojas mediante la expresión de una combinación de genes endógenos y genes transgénicos.

Ejemplo 7. Estudios en plantas transgénicas

5

EcCPFAS en semillas de *Arabidopsis*

El fragmento EcCPFAS (Ejemplo 6) se clonó en el sitio *EcoRI* de pCW442 que genera pCW393 (FP1-EcCPFAS) un vector de expresión específico de semilla usando el promotor truncado FP1 para impulsar la expresión de EcCPFAS. Este promotor es útil para la expresión de transgenes en semillas oleaginosas (Ellerstrom et al., 1996). Este vector se transformó en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1, y se usó para transformar plantas de *Arabidopsis* con la constitución doble mutante *fad2/fae1* mediante el método de inmersión floral. Las semillas transgénicas se seleccionaron en medios que contenían kanamicina (40 mg/l) y las semillas T2 de estas plantas se analizaron para determinar el contenido de DHS como se describe en el Ejemplo 1.

15

Siete líneas transformadas independientes de *Arabidopsis* se analizaron y el contenido de DHS varió desde niveles de trazas hasta 1 % de DHS, de acuerdo con los estudios descritos anteriormente.

20

GhCPFAS en semillas de *Arabidopsis* y cártamo

Se diseñó un vector de expresión binaria de plantas para la expresión de transgenes usando un promotor derivado del promotor del gen *AtOleosin1* (anotación de gen del sitio web de TAIR At4g25140). El promotor se modificó omitiéndose 6 pares de bases dentro de la secuencia de 1192 pb para eliminar sitios de enzimas de restricción comunes. El promotor AtOleosin se ha utilizado para la expresión potente específica de semillas de transgenes en cártamo y especies de *Brassica* (Nykiforuk et al., 2011; Van Rooijen and Moloney, 1995). Se cree que este promotor es bidireccional, dirigiendo no solo una potente expresión específica de semilla de transgenes colocados en el extremo 3' del promotor, sino también generando transcritos en la dirección opuesta al extremo 5' del promotor en diversos tejidos. El promotor de la oleosina de *Arabidopsis* comparte características del promotor de promotor de *Brassica napus*, caracterizado por tener una naturaleza bi-funcional (Sadanandom et al., 1996). El promotor se sintetizó químicamente y se subclonó en pGEMT-Easy y un fragmento *EcoRI* de este vector se cortó para producir extremos romos mediante la reacción de rellenado con la enzima Klenow y se ligó en el sitio *HindIII* con extremos romos Klenow de pCW265 (Belide et al., 2011), generando pCW600 (AtOleosinP:empty). Se ligó un fragmento flanqueado por *SpeI* de pCW618 que abarca la región codificante de GhCPFAS* en pCW600, generando pCW619 (AtOleosin:GhCPFAS*).

Este vector pCW619 se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 y se usó para transformar *Arabidopsis* de los genotipos mutantes *fad2* o *fad2fae1* mediante el medio de la inmersión floral. La misma construcción también se usó para transformar el cártamo de la variedad S317 (constitución con alto contenido de oleico) mediante un método que usa injerto (Belide et al., 2011). Se obtuvieron 15 líneas transformadas independientes del mutante *fad2* de *Arabidopsis* transformado con pCW619 y las semillas T2 de estas plantas están madurando. Se generaron 20 líneas transformadas independientes de cártamo S317 transformadas con pCW619 y las semillas de estas plantas están madurando. El contenido de DHS en las semillas se analiza y se comprueba que es elevado.

Discusión

Estos experimentos mostraron que la proteína supresora del silenciamiento V2 era ventajosa al permitir la sobreexpresión eficiente de uno o más genes junto con el silenciamiento de genes, en la misma célula. Aunque p19 permitió una excelente sobreexpresión de transgenes y fue más eficaz que V2 como supresor del silenciamiento, p19 también bloqueó parcialmente el silenciamiento de genes endógenos basado en horquillas. Se postula en el presente documento que V2 y sus homólogos funcionales bloquean la ruta de co-supresión que utiliza ARN polimerasa dependiente de ARN y SGS3 y, por lo tanto, maximiza la expresión de un gen deseado, pero tiene poco efecto sobre las rutas de silenciamiento mediante ARN en horquilla o microARN y, por lo tanto, permite el silenciamiento génico concomitante. El uso de V2 también permitió la expresión eficiente de numerosos genes adicionales a las células para formar una nueva ruta metabólica, usando vectores individuales (separados) o genes combinados en construcciones individuales, y por lo tanto, se pudieron ensamblar y probar rutas transgénicas completas en unos pocos días en los ensayos de expresión transitoria. Los inventores utilizaron los ensayos de hojas basados en V2 para determinar que GhCPFAS* era mucho mejor que EcCPFAS en la producción de DHS. Por último, Finalmente, los análisis optimizados en hojas demostraron que el ácido graso inusual DHS, producido en PC, se descargaba eficientemente en las reservas de CoA y se acumulaba en el aceite de la hoja. La acumulación del 15 % de DHS en los aceites foliares descrita aquí con GhCPFAS* excede los niveles descritos con cualquier CPFAS expresado en cualquier célula vegetal descrita en estudios previos. Tales movimientos eficientes de DHS entre las reservas de lípidos en las células foliares indicaron que las hojas podrían ser una ubicación ideal para la producción de DHS en lugar de una alternativa a las semillas oleaginosas.

Más allá de la ingeniería oleoquímica, imaginamos que los supresores del silenciamiento como V2 y sus homólogos serán útiles para una variedad de áreas de investigación básica y aplicada. Actualmente se están desarrollando ensayos de expresión transitoria en hojas para la producción rápida de anticuerpos personalizados (Levy et al., 2008),

65

sin embargo, los patrones de glicosilación y siliación de la planta deben ser 'humanizados' para lograr una eficacia total, lo que requiere silenciar varios genes en las células de la planta. El uso de sistemas de expresión transitoria en hojas como se describió anteriormente puede proporcionar una producción rápida de anticuerpos más adecuados para terapias humanas, o permitir que se realicen estudios de reemplazo de genes.

5

Ejemplo 8. Combinación de supresores del silenciamiento y microARN

Efecto de V2 o p19 sobre la actividad de un miARN artificial en plantas transformadas de manera estable

10 Las construcciones de miARN artificial (miARNA) pueden procesarse mediante vías de silenciamiento eucariotas, incluso en plantas, para generar un ARN de doble cadena de 21 nt de longitud con 2 extremos 3' protuberantes, desde el cual se carga una cadena de ARN en proteínas Argonauta para guiar el silenciamiento dirigido de un gen de interés, mientras que la segunda cadena (cadena pasajera) se degrada (Schwab et al., 2006). El ARNp altamente específico creado en los métodos de miARNA puede contrastarse con los diseños de silenciamiento basados en horquillas que
15 generan una gran población de ARNip, que varían en tamaño desde 20-24 nt que abarcan la longitud de la horquilla (por ejemplo, consultar la Figura 8). El p19 se probó para determinar si bloquearía la actividad de los miARN artificiales o al menos la reduciría significativamente, mientras que el V2 se probó para determinar si permitiría el silenciamiento cuando se combina con los miARN artificiales.

20 La influencia de V2 y p19 en un ejemplo de actividad de miARNA se probó de dos maneras, concretamente, el silenciamiento de miARNA de un gen que codifica un componente de la biogénesis de la clorofila (AtPDS) y el direccionamiento por el miARNA de un gen que codifica una enzima en la biosíntesis de aceite de semilla (AtFAD2). El silenciamiento del gen que codifica la fitoeno desaturasa (PDS) usando ARNi generó un fenotipo de hoja blanqueada (Helliwell et al., 2002). Una secuencia de pri-miARN de 915 pb de longitud dirigida a AtPDS se sintetizó químicamente
25 usando el mi159b como molde pri-miARNA (Millar y Gubler, 2005) (SEQ ID NO: 52) y se clonó en un vector de expresión 35S, generando pCW159 (35S-pri-miARN-PDS). Este fragmento 35S-pri-miARN-PDS-ocs3 'se eliminó mediante digestión enzimática y se ligó a los vectores binarios que expresan 35S-p19 y 35S-V2, generando construcciones de expresión para pCW160 (35S-19+35S-pri-miARN-PDS) y pCW161 (35S-V2-ocs+35S-pri-miARN-PDS), respectivamente. Estas construcciones, pCW159, pCW160 y pCW161 se introdujeron en *Agrobacterium* y se
30 usaron para transformar de manera estable *Arabidopsis thaliana* de ecotipo Col-0. Se seleccionaron semillas de plantas sumergidas en medios de selección de kanamicina y se contó el número de plántulas transformadas blanqueadas y no blanqueadas.

35 Las plántulas transformadas con el control 35S-pri-miARN-PDS, que por lo tanto solo tenían la construcción silenciadora de miARNA en ausencia de supresor del silenciamiento, estaban casi todas blanqueadas y sobrevivieron en cultivo tisular durante aproximadamente 3 semanas. Las plántulas transformadas con 35S-V2+35S-pri-miARN-PDS también mostraron solo el fenotipo blanqueado y no se distinguieron de las plántulas transformadas con 35S-pri-miARN-PDS. Por el contrario, las plántulas transformadas con el 35S-p19+35S-pri-miARN-PDS permanecieron verdes y viables. Estos resultados indican que V2 no interfirió con la biogénesis del miARNA en un contexto de
40 plántulas y permitió que la construcción de miARN silenciara el gen endógeno. Por el contrario, p19 bloqueó la acción del miARN, miARN-PDS, presumiblemente uniendo los dúplex de ARNdc de 21 nt generados durante el procesamiento del miARNA.

45 Como se ha descrito en los Ejemplos anteriores, FAD2 desatura 18:1-PC a 18:2-PC, y la ablación de este gen a través de una horquilla de ARN dio como resultado niveles elevados de 18:1. Se diseñó un pri-miARNA que tenía una longitud de 913 pb, usando la misma secuencia de molde de vector miARN195b que para la construcción de miARN de la PDS, dirigido al gen AtFAD2 (SEQ ID NO: 53) y se insertó en un vector de expresión específico, FP1-pORE4, generando pJP1106. Este vector fue introducido en *Agrobacterium* y se usó para transformar *Arabidopsis* del ecotipo Col-0 - este ecotipo tenía un gen FAD2 activo y consecuentemente bajos niveles de 18:1 en aceites de semillas. Las plantas transformadas de manera estable de este ecotipo se aislaron y analizaron para determinar el contenido de ácido oleico en el aceite de semilla. Una línea, HX13, se seleccionó por tener niveles considerablemente mayores de 18:1 en
50 aceites de semillas, y este evento se hizo homocigoto a través de la autofecundación de plantas en la generación T4. Las plantas HX13 homocigotas se supertransformaron con *Agrobacterium* que contenía vectores binarios que expresan FP1-p19 o FP1-V2 y semillas T1 de estas plantas (FP1-miARN-AtFAD2+FP1-V2) o (Fp1-miARN-AtFAD2+FP1-p19) se seleccionaron y se cultivaron en semillas T2 antes del análisis del perfil de aceite.

60 Las plantas HX13 que expresan Fp1-miARN-AtFAD2 exhibieron un contenido de ácido oleico del 65 % como porcentaje del total de ácidos grasos en el aceite de la semilla. Las plantas HX13 que coexpresan FP1-V2 además de la construcción de miARNA no se distinguían de las que contenían la construcción de miARNA sola, lo que indica que V2 no interfirió con la función del miARNA en las semillas y permitió que la construcción de silenciamiento de miARN silenciara como en ausencia del supresor del silenciamiento. Por el contrario, las plantas HX13 que coexpresaron la construcción FP1-p19 exhibieron niveles 18:1 notablemente reducidos en el aceite de la semilla, cayendo a niveles similares a los de las semillas del ecotipo Col-0 no transformado. Estos resultados indicaron que p19 suprimió el silenciamiento basado en el miARNA de un gen endógeno en semillas.

65

Cualquier tratamiento de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se han incluido en la

presente memoria descriptiva es únicamente con el propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe tomarse como una admisión de que alguno o todos estos asuntos forman parte de la base de la técnica anterior o eran conocimientos generales comunes en el campo relevante para la presente invención tal como existía antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de la presente solicitud.

5

Referencias

- Abdullah et al. (1986) *Biotech.* 4:1087.
 Al-Mariri et al. (2002) *Infect. Immun.* 70:1915-1923.
 10 Almeida and Allshire (2005) *TRENDS Cell Biol.* 15: 251-258.
 Alvarez et al. (2000) *Theor. Appl. Genet.* 100:319-327.
 Bakker et al. (2006) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:7577-7582).
 Bao et al. (2002) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:7172-7177).
 Bao et al. (2003) *Journal of Biological Chemistry* 278:12846-12853.
 15 Baumlein et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 225:459-467.
 Baumlein et al. (1992) *Plant J.* 2:233-239.
 Beclin et al. (2002) *Current Biology* 12:684-688.
 Belide et al. (2011) *Plant Methods* 7:12.
 Bligh and Dyer (1959). *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917.
 20 Bouvier-Nave et al. (2000). *European Journal of Biochemistry* 267: 85-96.
 Broothaerts et al. (2005) *Nature* 433:629-633.
 Brosnan et al. (2007) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:14741-14746).
 Broun et al. (1998) *Plant J.* 13:201-210.
 Cadwell and Joyce (1992) *PCR Methods Appl.* 2:28-33.
 25 Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657.
 Chikwamba et al. (2003) (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:11127-11132).
 Chung et al. (2006) *BMC Genomics* 7:120.
 Clough and Bent (1998) *Plant J.* 16:735-743.
 Coco et al. (2001) *Nature Biotechnology* 19:354-359.
 30 Coco et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20:1246-1250.
 Courvalin et al. (1995) *Life Sci.* 318:1209-1212.
 Cramer et al. (1998) *Nature* 391:288-291.
 Darji et al. (1997) *Cell* 91:765-775.
 Dietrich et al. (1998) *Nature Biotech.* 18:181-185.
 35 Eggert et al. (2005) *Chembiochem* 6:1062-1067.
 Ellerstrom et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:1019-1027.
 Elmayan et al. (1998) *Plant Cell* 10: 1747-1757.
 Fennelly et al. (1999) *J. Immunol.* 162:1603-1610.
 Fujimura et al. (1985) *Plant Tissue Culture Lett.* 2:74.
 40 Fukunaga and Doudna (2009) *EMBO Journal* 28:545-555.
 Glevin et al. (2003) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:16-37.
 Glick et al. (2008) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:157-161).
 Grant et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 15:254-258.
 Grillot-Courvalin et al. (1998) *Nature Biotech.* 16:862-866.
 45 Grillot-Courvalin (1999) *Curr. Opin. Biotech.* 10:477-481.
 Harayama (1998) *Trends Biotechnol.* 16:76-82.
 Helliwell et al. (2002) *Functional Plant Biology* 29:1217-1225.
 Helliwell et al. (2006) *Plant Journal* 46:183-192.
 Hense et al. (2001) *Cell Microbiol.* 3:599-609.
 50 Hillman et al. (1989) *Virology* 169:42-50.
 Hinchee et al. (1988) *Biotechnology* 6:915-922.
 Horvath et al. (2000) (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:1914-1919).
 James et al. (1995) *Plant Cell* 7: 309-319.
 Jézéquel et al. (2008) *Biotechniques* 45:523-532.
 55 Johansen and Carrington (2001) *Plant Physiology* 126:930-938.
 Katavic et al. (1995) *Plant Physiology* 108: 399-409.
 Koziel et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:393-405.
 Kunik et al. (2001) (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:1871-1876).
 Lacroix et al. (2008) (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:15429-15434).
 60 Levy et al. (2008) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:10131-10136).
 Millar and Waterhouse (2005) *Funct. Integr. Genomics* 5:129-135.
 Millar et al. (1998) *Plant Cell* 10:1889-1902.
 Millar and Gubler (2005) *Plant Cell* 17(3):705-721.
 Mourrain et al. (2000) *Cell* 101:533-542.
 65 Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
 Ness et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20:1251-1255.

- Niedz et al. (1995) *Plant Cell Reports* 14:403.
 Nykiforuk et al. (2011) *Plant Biotechnology Journal* 9:250-263.
 Ohlrogge and Browse (1995) *Plant Cell* 7:957-970.
 5 Ostermeier et al. (1999) *Nature Biotechnology* 17:1205-1209.
 Ow et al. (1986) *Science* 234:856-859.
 Pasquinelli et al (2005) *Curr. Opin. Genet. Develop.* 15:200-205.
 Perrin et al. (2000) *Mol. Breed* 6:345-352.
 Peterson et al. (1997). *Plant Molecular Biology Reporter* 15:148-153.
 10 Petrie et al. (2010) *Plant Methods* 6:8.
 Potenza et al. (2004) *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 40:1-22.
 Powell et al. (1996) *Vaccines* 183, Abstract.
 Prasher et al. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127:31-36.
 Sadanandom et al. (1996) *Plant Journal* 10:235-242.
 Schaffner et al. (1980) (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:2163-2167).
 15 Schwab et al. (2006) *Plant Cell* 18: 1121-1133.
 Scott et al. (2010) *Plant Biotechnology Journal* 8:912-927.
 Shiau et al. (2001) *Vaccine* 19:3947-3956.
 Sieber et al. (2001) *Nature Biotechnology* 19:456-460.
 Sizemore et al. (1995) *Science* 270:299-302.
 20 Smith et al. (2000) *Nature* 407:319-320.
 Stalker et al. (1988) *Science* 242:419-423.
 Stemmer (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751.
 Stemmer (1994b) *Nature* 370:389-391.
 Taylor (1997) *The Plant Cell* 9:1245-1249.
 25 Thillet et al. (1988) *J. Biol. Chem* 263:12500-12508.
 Toriyama et al. (1986) *Theor. Appl. Genet.* 205:34.
 Tzen et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 15626-15634.
 Tzfira and Citovsky (2006) *Curr. Opin. Biotech.* 17:147-154.
 Van Rooijen and Moloney (1995) *Bio-Technology* 13:72-77.
 30 Voinnet et al. (2003) *Plant Journal* 33:949-956.
 Volkov et al. (1999) *Nucleic acids research* 27:e18.
 Waterhouse et al (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13959-13964.
 Weiss et al. (2003) *Int. J. Med. Microbiol.* 293:95:106.
 Wood et al. (2009) *Plant Biotechnology Journal* 7:914-924.
 35 Yang et al. (2003) *Planta* 216:597-603.
 Ye et al. (2003) *Nature* 426:874-878.
 Yu et al. (2011) *BMC Plant Biology* 11:97.
 Zhao et al. (1998) *Nature Biotechnology* 16:258-261.
- 40 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation Grains Research and Development Corporation
- 45 <120> Silenciamiento génico y supresión del silenciamiento génico simultáneos en la misma célula
- <130> 512808
- <150> 61/580.574
- 50 <151> 2011-12-27
- <160> 53
- <170> PatentIn versión 3.5
- 55 <210> 1
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> virus del rizado amarillo de la hoja del tomate
- 60 <400> 1

ES 2 744 240 T3

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
 1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ser Val Glu Glu Thr Tyr
 20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
 35 40 45

Val Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
 50 55 60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Pro Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
 65 70 75 80

Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Thr
 85 90 95

Ile Met Asp Val Gln Ala His Val Pro Glu Ala Gln Asn Ile Gln Asn
 100 105 110

Val Ser Lys Pro
 115

- <210> 2
- <211> 172
- 5 <212> PRT
- <213> virus del enanismo arbustivo del tomate
- <400> 2

ES 2 744 240 T3

Met Glu Arg Ala Ile Gln Gly Asn Asp Ala Arg Glu Gln Ala Asn Ser
 1 5 10 15

Glu Arg Trp Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Thr Ser Pro Phe Lys Leu
 20 25 30

Pro Asp Glu Ser Pro Ser Trp Thr Glu Trp Arg Leu His Asn Asp Glu
 35 40 45

Thr Asn Ser Asn Gln Asp Asn Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Gly
 50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Arg Thr Glu
 65 70 75 80

Ala Ser Leu His Arg Val Leu Gly Ser Trp Thr Gly Asp Ser Val Asn
 85 90 95

Tyr Ala Ala Ser Arg Phe Phe Gly Phe Asp Gln Ile Gly Cys Thr Tyr
 100 105 110

Ser Ile Arg Phe Arg Gly Val Ser Ile Thr Val Ser Gly Gly Ser Arg
 115 120 125

Thr Leu Gln His Leu Cys Glu Met Ala Ile Arg Ser Lys Gln Glu Leu
 130 135 140

Leu Gln Leu Ala Pro Ile Glu Val Glu Ser Asn Val Ser Arg Gly Cys
 145 150 155 160

Pro Glu Gly Thr Glu Thr Phe Glu Lys Glu Ser Glu
 165 170

<210> 3
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> virus del rizado amarillo de la hoja del tomate

<400> 3

atgtgggatac cacttctaaa tgaatttcct gaatctgttc acggatttcg ttgtatgtta 60

gctattaaat atttgcagtc cgttgaggaa acttacgagc ccaatacatt gggccacgat 120

ttaattaggg atcttataatc tgttgtaagg gcccgtagc atgtcgaagc gaccaggcga 180

tataatcatt tccacgcccg cctcgaaggt tcgccgaagg ctgaacttcg acagcccata 240

cagcagccgt gctgctgtcc ccattgtcca aggcacaaac aagcgacgat catggacgta 300

caggcccatg taccggaagc ccagaatata cagaatgtat cgaagccctg a 351

5

10

ES 2 744 240 T3

<210> 4
 <211> 519
 <212> ADN
 <213> virus del enanismo arbustivo del tomate

5 <400> 4

```

atggaacgag ctatacaagg aaacgacgct agggaacaag ctaacagtga acgttgggat      60
ggaggatcag gaggtaccac ttctcccttc aaacttcctg acgaaagtcc gagttggact      120
gagtggcggc tacataacga tgagacgaat tcgaatcaag ataatcccct tggtttcaag      180
gaaagctggg gtttcgggaa agttgtatth aagagatatc tcagatacga caggacggaa      240
gcttcactgc acagagtcct tggatcttgg acgggagatt cggttaacta tgcagcatct      300
cgatthtttcg gtttcgacca gatcggatgt acctatagta ttcggtttcg aggagttagt      360
atcaccgtht ctggagggtc gcgaactctt cagcatctct gtgagatggc aattcgggtct      420
aagcaagaac tgctacagct tgccccaatc gaagtggaaa gtaatgtatc aagaggatgc      480
cctgaaggta ctgagacctt cgaaaaagaa agcgagtaa                                519
    
```

10 <210> 5
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Sesamum indicum

15 <400> 5

ES 2 744 240 T3

Met Ala Glu His Tyr Gly Gln Gln Gln Gln Thr Arg Ala Pro His Leu
 1 5 10 15

Gln Leu Gln Pro Arg Ala Gln Arg Val Val Lys Ala Ala Thr Ala Val
 20 25 30

Thr Ala Gly Gly Ser Leu Leu Val Leu Ser Gly Leu Thr Leu Ala Gly
 35 40 45

Thr Val Ile Ala Leu Thr Ile Ala Thr Pro Leu Leu Val Ile Phe Ser
 50 55 60

Pro Val Leu Val Pro Ala Val Ile Thr Ile Phe Leu Leu Gly Ala Gly
 65 70 75 80

Phe Leu Ala Ser Gly Gly Phe Gly Val Ala Ala Leu Ser Val Leu Ser
 85 90 95

Trp Ile Tyr Arg Tyr Leu Thr Gly Lys His Pro Pro Gly Ala Asp Gln
 100 105 110

Leu Glu Ser Ala Lys Thr Lys Leu Ala Ser Lys Ala Arg Glu Met Lys
 115 120 125

Asp Arg Ala Glu Gln Phe Ser Gln Gln Pro Val Ala Gly Ser Gln Thr
 130 135 140

Ser
 145

<210> 6
 <211> 438
 <212> ADN
 <213> Sesamum indicum

<400> 6

atggctgagc attatggtca acaacagcag accagggcgc ctcacctgca gctgcagccg 60
 cgcgccagc gggtagtgaa ggcggccacc gccgtgacag ccggcggctc gcttctcgtc 120
 ctctctggcc tcactttagc cggaactggt attgcgctca ccatcgccac tccgctgctt 180
 gtgatcttta gccccgttct ggtgccggcg gtcataacca ttttcttgct ggggtgcgggt 240
 tttctggcat ccggaggctt cggcgtggcg gcgctgagtg tgctgtcgtg gatttacaga 300
 tatctgacag ggaaacaccc gccggggcg gatcagctgg aatcggcaaa gacgaagctg 360
 gcgagcaagg cgcgagagat gaaggatagg gcagagcagt tctcgcagca gcctgttgcg 420
 gggctctcaaa cttcttga 438

5

10

ES 2 744 240 T3

<210> 7
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

5

<400> 7

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Ser | Val | Asn | Val | Lys | Leu | Leu | Tyr | Arg | Tyr | Val | Leu | Thr | Asn |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Phe | Phe | Asn | Leu | Cys | Leu | Phe | Pro | Leu | Thr | Ala | Phe | Leu | Ala | Gly | Lys |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala | Ser | Arg | Leu | Thr | Ile | Asn | Asp | Leu | His | Asn | Phe | Leu | Ser | Tyr | Leu |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gln | His | Asn | Leu | Ile | Thr | Val | Thr | Leu | Leu | Phe | Ala | Phe | Thr | Val | Phe |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Leu | Val | Leu | Tyr | Ile | Val | Thr | Arg | Pro | Asn | Pro | Val | Tyr | Leu | Val |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asp | Tyr | Ser | Cys | Tyr | Leu | Pro | Pro | Pro | His | Leu | Lys | Val | Ser | Val | Ser |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |

ES 2 744 240 T3

Lys Val Met Asp Ile Phe Tyr Gln Ile Arg Lys Ala Asp Thr Ser Ser
100 105 110

Arg Asn Val Ala Cys Asp Asp Pro Ser Ser Leu Asp Phe Leu Arg Lys
115 120 125

Ile Gln Glu Arg Ser Gly Leu Gly Asp Glu Thr Tyr Ser Pro Glu Gly
130 135 140

Leu Ile His Val Pro Pro Arg Lys Thr Phe Ala Ala Ser Arg Glu Glu
145 150 155 160

Thr Glu Lys Val Ile Ile Gly Ala Leu Glu Asn Leu Phe Glu Asn Thr
165 170 175

Lys Val Asn Pro Arg Glu Ile Gly Ile Leu Val Val Asn Ser Ser Met
180 185 190

Phe Asn Pro Thr Pro Ser Leu Ser Ala Met Val Val Asn Thr Phe Lys
195 200 205

Leu Arg Ser Asn Ile Lys Ser Phe Asn Leu Gly Gly Met Gly Cys Ser
210 215 220

Ala Gly Val Ile Ala Ile Asp Leu Ala Lys Asp Leu Leu His Val His
225 230 235 240

Lys Asn Thr Tyr Ala Leu Val Val Ser Thr Glu Asn Ile Thr Gln Gly
245 250 255

Ile Tyr Ala Gly Glu Asn Arg Ser Met Met Val Ser Asn Cys Leu Phe
260 265 270

Arg Val Gly Gly Ala Ala Ile Leu Leu Ser Asn Lys Ser Gly Asp Arg
275 280 285

Arg Arg Ser Lys Tyr Lys Leu Val His Thr Val Arg Thr His Thr Gly
290 295 300

Ala Asp Asp Lys Ser Phe Arg Cys Val Gln Gln Glu Asp Asp Glu Ser
305 310 315 320

Gly Lys Ile Gly Val Cys Leu Ser Lys Asp Ile Thr Asn Val Ala Gly
325 330 335

Thr Thr Leu Thr Lys Asn Ile Ala Thr Leu Gly Pro Leu Ile Leu Pro
340 345 350

ES 2 744 240 T3

Leu Ser Glu Lys Phe Leu Phe Phe Ala Thr Phe Val Ala Lys Lys Leu
 355 360 365

Leu Lys Asp Lys Ile Lys His Tyr Tyr Val Pro Asp Phe Lys Leu Ala
 370 375 380

Val Asp His Phe Cys Ile His Ala Gly Gly Arg Ala Val Ile Asp Glu
 385 390 395 400

Leu Glu Lys Asn Leu Gly Leu Ser Pro Ile Asp Val Glu Ala Ser Arg
 405 410 415

Ser Thr Leu His Arg Phe Gly Asn Thr Ser Ser Ser Ser Ile Trp Tyr
 420 425 430

Glu Leu Ala Tyr Ile Glu Ala Lys Gly Arg Met Lys Lys Gly Asn Lys
 435 440 445

Ala Trp Gln Ile Ala Leu Gly Ser Gly Phe Lys Cys Asn Ser Ala Val
 450 455 460

Trp Val Ala Leu Arg Asn Val Lys Ala Ser Ala Asn Ser Pro Trp Gln
 465 470 475 480

His Cys Ile Asp Arg Tyr Pro Val Lys Ile Asp Ser Asp Leu Ser Lys
 485 490 495

Ser Lys Thr His Val Gln Asn Gly Arg Ser
 500 505

<210> 8
 <211> 1842
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

gaattcggta ccccgggttc gaaatcgata agcttggatc tcgatcccgc gaaattaata 60
 cgactcacta tagggagacc acaacggttt ccctctgggt aaatttctag tttttctcct 120
 tcattttctt ggtaggacc cttttctctt tttatttttt tgagctttga tctttcttta 180
 aactgatcta ttttttaatt gattggttat ggtgtaaata ttacatagct ttaactgata 240
 atctgattac tttatttcgt gtgtctatga tgatgatgat agttacagaa cgggcccgcg 300
 ccgaattcga taaacagagc aatgacgtcc gttaacgtta agctccttta ccgttacgtc 360
 ttaaccaact ttttcaacct ctgtttgttc ccgttaacgg cgttcctcgc cggaaaagcc 420
 tctcggctta ccataaacga tctccacaac ttcctttcct atctccaaca caaccttata 480

5

10

ES 2 744 240 T3

```

acagtaactt tactctttgc tttcactggt ttcggtttgg ttctctacat cgtaaccgga      540
cccaatccgg tttatctcgt tgactactcg tgttaccttc caccaccgca tctcaaagtt      600
agtgtctcta aagtcatgga tattttctac caaataagaa aagctgatac ttcttcacgg      660
aacgtggcat gtgatgatcc gtctctgctc gatttcctga ggaagattca agagcgttca      720
ggctctaggtg atgagacgta cagtctgag ggactcattc acgtaccacc gcggaagact      780
tttgcagcgt cacgtgaaga gacagagaag gttatcatcg gtgcgctcga aaatctattc      840
gagaacacca aagttaaccg tagagagatt ggtatacttg tggatgaactc aagcatgttt      900
aatccaactc cttcgtatc cgctatggtc gttaatactt tcaagctccg aagcaacatc      960
aaaagcttta atctaggagg aatgggttgt agtgctgggtg ttattgccat tgatttggct     1020
aaagacttgt tgcattgtca taaaaaactt tatgctcttg tggatgagcac tgagaacatc     1080
acacaaggca tttatgctgg agaaaataga tcaatgatgg ttagcaattg cttgtttcgt     1140
gttgggtgggg ccgcatgttt gctctctaac aagtcgggag accggagacg gtccaagtac     1200
aagctagttc acacggtccg aacgcatact ggagctgatg acaagtcttt tcgatgtgtg     1260
caacaagaag acgatgagag cggcaaaaatc ggagtttgtc tgtcaaagga cataaccaat     1320
gttgcgggga caacacttac gaaaaatata gcaacattgg gtccgttgat tcttccttta     1380
agcgaaaagt ttcttttttt cgctaccttc gtcgccaaga aacttctaaa ggataaaatc     1440
aagcattact atgttccgga tttcaagctt gctggtgacc atttctgtat tcatgccgga     1500
ggcagagccg tgatcgatga gctagagaag aacttaggac tatcgccgat cgatgtggag     1560
gcatctagat caacgttaca tagatttggg aatacttcat cttagctcaat ttggatgaa     1620
ttagcataca tagaggcaaa ggaagaatg aagaaagga ataaagcttg gcagattgct     1680
ttaggatcag ggtttaagtg taatagtgcg gtttgggtgg ctctacgcaa tgtcaaggca     1740
tcggcaaata gtccttggca acattgcatc gatagatata cggttaaaat tgattctgat     1800
ttgtcaaagt caaagactca tgtccaaaac ggtcggctct aa                          1842

```

<210> 9
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 9

Met Ala Ile Leu Asp Ser Ala Gly Val Thr Thr Val Thr Glu Asn Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Glu Phe Val Asp Leu Asp Arg Leu Arg Arg Arg Lys Ser Arg
 20 25 30

5

10

ES 2 744 240 T3

Ser Asp Ser Ser Asn Gly Leu Leu Leu Ser Gly Ser Asp Asn Asn Ser
 35 40 45

Pro Ser Asp Asp Val Gly Ala Pro Ala Asp Val Arg Asp Arg Ile Asp
 50 55 60

Ser Val Val Asn Asp Asp Ala Gln Gly Thr Ala Asn Leu Ala Gly Asp
 65 70 75 80

Asn Asn Gly Gly Gly Asp Asn Asn Gly Gly Gly Arg Gly Gly Gly Glu
 85 90 95

Gly Arg Gly Asn Ala Asp Ala Thr Phe Thr Tyr Arg Pro Ser Val Pro
 100 105 110

Ala His Arg Arg Ala Arg Glu Ser Pro Leu Ser Ser Asp Ala Ile Phe
 115 120 125

Lys Gln Ser His Ala Gly Leu Phe Asn Leu Cys Val Val Val Leu Ile
 130 135 140

Ala Val Asn Ser Arg Leu Ile Ile Glu Asn Leu Met Lys Tyr Gly Trp
 145 150 155 160

Leu Ile Arg Thr Asp Phe Trp Phe Ser Ser Arg Ser Leu Arg Asp Trp
 165 170 175

Pro Leu Phe Met Cys Cys Ile Ser Leu Ser Ile Phe Pro Leu Ala Ala
 180 185 190

Phe Thr Val Glu Lys Leu Val Leu Gln Lys Tyr Ile Ser Glu Pro Val
 195 200 205

Val Ile Phe Leu His Ile Ile Ile Thr Met Thr Glu Val Leu Tyr Pro
 210 215 220

Val Tyr Val Thr Leu Arg Cys Asp Ser Ala Phe Leu Ser Gly Val Thr
 225 230 235 240

Leu Met Leu Leu Thr Cys Ile Val Trp Leu Lys Leu Val Ser Tyr Ala
 245 250 255

His Thr Ser Tyr Asp Ile Arg Ser Leu Ala Asn Ala Ala Asp Lys Ala
 260 265 270

Asn Pro Glu Val Ser Tyr Tyr Val Ser Leu Lys Ser Leu Ala Tyr Phe
 275 280 285

ES 2 744 240 T3

Met Val Ala Pro Thr Leu Cys Tyr Gln Pro Ser Tyr Pro Arg Ser Ala
 290 295 300

Cys Ile Arg Lys Gly Trp Val Ala Arg Gln Phe Ala Lys Leu Val Ile
 305 310 315 320

Phe Thr Gly Phe Met Gly Phe Ile Ile Glu Gln Tyr Ile Asn Pro Ile
 325 330 335

Val Arg Asn Ser Lys His Pro Leu Lys Gly Asp Leu Leu Tyr Ala Ile
 340 345 350

Glu Arg Val Leu Lys Leu Ser Val Pro Asn Leu Tyr Val Trp Leu Cys
 355 360 365

Met Phe Tyr Cys Phe Phe His Leu Trp Leu Asn Ile Leu Ala Glu Leu
 370 375 380

Leu Cys Phe Gly Asp Arg Glu Phe Tyr Lys Asp Trp Trp Asn Ala Lys
 385 390 395 400

Ser Val Gly Asp Tyr Trp Arg Met Trp Asn Met Pro Val His Lys Trp
 405 410 415

Met Val Arg His Ile Tyr Phe Pro Cys Leu Arg Ser Lys Ile Pro Lys
 420 425 430

Thr Leu Ala Ile Ile Ile Ala Phe Leu Val Ser Ala Val Phe His Glu
 435 440 445

Leu Cys Ile Ala Val Pro Cys Arg Leu Phe Lys Leu Trp Ala Phe Leu
 450 455 460

Gly Ile Met Phe Gln Val Pro Leu Val Phe Ile Thr Asn Tyr Leu Gln
 465 470 475 480

Glu Arg Phe Gly Ser Thr Val Gly Asn Met Ile Phe Trp Phe Ile Phe
 485 490 495

Cys Ile Phe Gly Gln Pro Met Cys Val Leu Leu Tyr Tyr His Asp Leu
 500 505 510

Met Asn Arg Lys Gly Ser Met Ser
 515 520

<210> 10
 <211> 1563
 <212> ADN

ES 2 744 240 T3

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

```

atggcgattt tggattctgc tggcgttact acggtgacgg agaacggtgg cggagagttc      60
gtcgatcttg ataggcttcg tcgacggaaa tcgagatcgg attcttctaa cggacttctt      120
ctctctgggtt ccgataataa ttctccttcg gatgatggtg gagctcccgc cgacgtagg      180
gatcggattg attccgttgt taacgatgac gctcagggaa cagccaattt ggccggagat      240
aataacggtg gtggcgataa taacggtggt ggaagaggcg gcggagaagg aagaggaaac      300
gccgatgcta cgtttacgta tcgaccgtcg gttccagctc atcggagggc gagagagagt      360
ccacttagct ccgacgcaat cttcaaacag agccatgccg gattattcaa cctctgtgta      420
gtagttctta ttgctgtaaa cagtagactc atcatcgaaa atcttatgaa gtatggttgg      480
ttgatcagaa cggatttctg gtttagttca agatcgctgc gagattggcc gcttttcatg      540
tgttgatat cccttctgat ctttcctttg gctgccttta cggttgagaa attggtactt      600
cagaaataca tadcagaacc tgttgctatc tttcttcata ttattatcac catgacagag      660
gttttgtatc cagtttacgt caccctaagg tgtgattctg cttttttatc aggtgtcact      720
ttgatgctcc tcacttgcat tgtgtggcta aagttggttt cttatgctca tactagctat      780
gacataagat ccctagccaa tgcagctgat aaggccaatc ctgaagtctc ctactacgtt      840
agcttgaaga gcttggcata tttcatggtc gctcccacat tgtgttatca gccaaagtat      900
ccacgttctg catgtatacg gaagggttgg gtggctcgtc aatttgcaa actggtcata      960
ttcaccggat tcatgggatt tataatagaa caatatataa atcctattgt caggaactca     1020
aagcatcctt tgaaaggcga tcttctatat gctattgaaa gagtgttgaa gctttcagtt     1080
ccaaatztat atgtgtggct ctgcatgttc tactgcttct tccacctttg gttaaacata     1140
ttggcagagc ttctctgctt cggggatcgt gaattctaca aagattggtg gaatgcaaaa     1200
agtgtgggag attactggag aatgtggaat atgcctgttc ataaatggat ggttcgacat     1260
atatacttcc cgtgcttgcg cagcaagata ccaaagacac tcgccattat cattgctttc     1320
ctagtctctg cagtcttca tgagctatgc atcgcagttc cttgtcgtct cttcaagcta     1380
tgggcttttc ttgggattat gtttcaggtg cttttggtct tcatcacaaa ctatctacag     1440
gaaaggtttg gctcaacggt ggggaacatg atcttctggt tcatcttctg cattttcggg     1500
caaccgatgt gtgtgcttct ttattaccac gacctgatga accgaaaagg atcgatgtca     1560
tga

```

5

<210> 11

<211> 383

<212> PRT

10 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 11

ES 2 744 240 T3

Met Gly Ala Gly Gly Asn Met Ser Leu Val Thr Ser Lys Thr Gly Glu
1 5 10 15

Lys Lys Asn Pro Leu Glu Lys Val Pro Thr Ser Lys Pro Pro Phe Thr
20 25 30

Val Gly Asp Ile Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Gln Arg Ser
35 40 45

Leu Val Arg Ser Phe Ser Tyr Val Val Tyr Asp Leu Leu Leu Val Ser
50 55 60

Val Phe Tyr Tyr Ile Ala Thr Thr Tyr Phe His Leu Leu Pro Ser Pro
65 70 75 80

Tyr Cys Tyr Leu Ala Trp Pro Ile Tyr Trp Ile Cys Gln Gly Cys Val
85 90 95

Cys Thr Gly Ile Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe
100 105 110

Ser Asp Tyr Gln Trp Val Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Leu His Ser
115 120 125

Ala Leu Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His
130 135 140

His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys
145 150 155 160

Pro Lys Ser Gln Leu Gly Trp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Pro
165 170 175

Gly Arg Val Ile Ser Leu Thr Ile Thr Leu Thr Leu Gly Trp Pro Leu
180 185 190

Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg His Tyr Asp Arg Phe Ala Cys
195 200 205

His Tyr Asp Pro Tyr Gly Pro Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Leu Gln
210 215 220

Ile Phe Leu Ser Asp Ala Gly Val Ile Gly Ala Gly Tyr Leu Leu Tyr
225 230 235 240

ES 2 744 240 T3

Arg Ile Ala Leu Val Lys Gly Leu Ala Trp Leu Val Cys Met Tyr Gly
 245 250 255

Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu
 260 265 270

Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Asp
 275 280 285

Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Leu
 290 295 300

Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Val His His Leu
 305 310 315 320

Phe Ser Thr Met Pro His Tyr Asn Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala Val
 325 330 335

Lys Pro Leu Leu Gly Asp Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Val Phe
 340 345 350

Lys Ala Met Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Lys Asp
 355 360 365

Glu Ala Ser Gln Gly Lys Gly Val Phe Trp Tyr Lys Asn Lys Phe
 370 375 380

<210> 12
 <211> 661
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> horquilla de ARNp dirigida a la FAD2 de N. benthamiana

<400> 12

tagaacagat ggtgcacgac gtgagtatcg gtgatgttgt ggaagacctt gtttagaatg 60
 ccatagtctc tgtcgacggt tgccaaagct ccccttagcc aatcccattc ggatgaatcg 120
 tagtgaggca atgacgggtg agtgtgctgc aaataagtga tcaagacgag gaagccgttc 180
 acgattagga gtggtacgcc atacatacac acgagccaag ctagcccttt taccaaggca 240
 atacgatata gtagataacc agtccaata actccagcat cagaaaggaa gatctgtagc 300
 ctctcgcggt cattgtagat tgggccgtaa gggcatagt gacatgcaa gcgatcataa 360
 tgtcggccag aacattgaa agccaagtac aaaggccagc caagagtaag ggtgatcgta 420
 agtgaataa cccggcctgg tggattgttc aagtacttgg aataccatcc gagttgtgat 480
 ttcggcttag gcacaaaaac ctcatcgcgc tcgagtgagc cagtgttga gtggtggcga 540
 cgatgactat atttccaaga gaagtagggc accatcagag cagagtggag gataagcccg 600
 acagtgtcat caaccactg gtagtcacta aaggcatggt ggccacattc gtgcgcaata 660
 a 661

ES 2 744 240 T3

| | | |
|----|---|----|
| 5 | <210> 13 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> Cebador directo | |
| 10 | <400> 13 tcattgcgca cgaatgtggc caccat | 26 |
| | <210> 14 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 15 | <220> <223> cebador inverso | |
| 20 | <400> 14 Cgagaacaga tggcgcacga cg | 22 |
| | <210> 15 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 25 | <220> <223> Cebador directo | |
| 30 | <400> 15 Aacgcgttcg acgaattaat tccaatccca ca | 32 |
| | <210> 16 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 35 | <220> <223> cebador inverso | |
| 40 | <400> 16 acgcgtctgc tgagcctcga catgtt | 26 |
| | <210> 17 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> <223> Cebador directo | |
| 50 | <400> 17 ttatgggag ctggtggtaa tatgt | 25 |
| | <210> 18 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 55 | <220> <223> cebador inverso | |
| 60 | <400> 18 ccctcagaat ttgttttgt accagaaa | 28 |
| | <210> 18 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 65 | <220> <223> cebador inverso | |

ES 2 744 240 T3

<210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador directo
 <400> 19
 10 ttactagtat g gatgctgca catggtatct 30
 <210> 20
 <211> 36
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso
 20 <400> 20
 ttactagttc aatcatccat gaaggaatat gcagaa 36
 <210> 21
 <211> 468
 25 <212> PRT
 <213> Gossypium hirsutum
 <400> 21
 Met Asp Ala Ala His Gly Ile Leu Gly Lys His Ser Ser Val Pro Pro
 1 5 10 15
 Ser Pro Lys Asn Met Ser Pro Ser Leu Pro Lys Asn Met Ser Pro Ser
 20 25 30
 Phe Met Glu Thr Thr Ala Arg Leu Phe Val Thr Lys Phe Phe Gln Gln
 35 40 45
 Tyr Ile Ser Met Gly Cys Val Ile Phe Leu Glu Glu Gly Gly Arg Ile
 50 55 60
 30

ES 2 744 240 T3

Phe Thr Phe Lys Gly Asn Met Glu Lys Cys Pro Leu Lys Thr Val Leu
 65 70 75 80
 Lys Val His Asn Pro Gln Phe Tyr Trp Arg Ile Met Lys Glu Ala Asp
 85 90 95
 Ile Gly Leu Ala Asp Ala Tyr Ile His Gly Asp Phe Ser Phe Leu Asp
 100 105 110
 Glu Asn Glu Gly Leu Leu Asn Leu Phe Arg Ile Leu Val Ala Asn Lys
 115 120 125
 Glu Asn Ser Ala Ala Ser Gly Ser Thr Lys Arg Arg Thr Trp Trp Ser
 130 135 140
 Pro Ala Leu Leu Thr Ala Ser Ile Ser Ser Ala Lys Tyr Phe Val Lys
 145 150 155 160
 His Leu Leu Arg Gln Asn Thr Ile Thr Gln Ala Arg Arg Asn Ile Ser
 165 170 175
 Arg His Tyr Asp Leu Ser Asn Glu Leu Phe Ser Leu Tyr Leu Gly Lys
 180 185 190
 Met Met Gln Tyr Ser Ser Gly Val Phe Arg Thr Gly Glu Glu His Leu
 195 200 205
 Asp Val Ala Gln Arg Arg Lys Ile Ser Ser Leu Ile Glu Lys Thr Arg
 210 215 220
 Ile Glu Lys Trp His Glu Val Leu Asp Ile Gly Cys Gly Trp Gly Ser
 225 230 235 240
 Leu Ala Ile Glu Thr Val Lys Arg Thr Gly Cys Lys Tyr Thr Gly Ile
 245 250 255
 Thr Leu Ser Glu Gln Gln Leu Lys Tyr Ala Gln Glu Lys Val Lys Glu
 260 265 270
 Ala Gly Leu Glu Asp Asn Ile Lys Ile Leu Leu Cys Asp Tyr Arg Gln
 275 280 285
 Leu Pro Lys Glu His Gln Phe Asp Arg Ile Ile Ser Val Glu Met Val
 290 295 300
 Glu His Val Gly Glu Glu Tyr Ile Glu Glu Phe Tyr Arg Cys Cys Asp
 305 310 315 320

ES 2 744 240 T3

Gln Leu Leu Lys Glu Asp Gly Leu Phe Val Leu Gln Phe Ile Ser Ile
 325 330 335

Pro Glu Glu Leu Ser Lys Glu Ile Gln Gln Thr Ala Gly Phe Leu Lys
 340 345 350

Glu Tyr Ile Phe Pro Gly Gly Thr Leu Leu Ser Leu Asp Arg Asn Leu
 355 360 365

Ser Ala Met Ala Ala Ala Thr Arg Phe Ser Val Glu His Val Glu Asn
 370 375 380

Ile Gly Met Ser Tyr Tyr His Thr Leu Arg Trp Trp Arg Lys Leu Phe
 385 390 395 400

Leu Lys Asn Thr Ser Lys Val Leu Ala Leu Gly Phe Asp Glu Lys Phe
 405 410 415

Met Arg Thr Trp Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Cys Ala Ala Gly Phe Lys
 420 425 430

Thr Gly Thr Leu Ile Asp Tyr Gln Val Val Phe Ser Arg Ala Gly Asn
 435 440 445

Phe Gly Thr Leu Gly Asp Pro Tyr Lys Gly Phe Pro Ser Ala Tyr Ser
 450 455 460

Phe Met Asp Asp
 465

<210> 22
 <211> 873
 <212> PRT
 <213> Gossypium hirsutum

5

<400> 22

Met Glu Val Ala Val Ile Gly Gly Gly Ile Lys Gly Leu Leu Ser Ala
 1 5 10 15

Tyr Val Leu Val Lys Ala Gly Val Asp Val Val Val Tyr Glu Lys Glu
 20 25 30

Glu Gln Leu Gly Gly His Ala Lys Thr Val Asn Phe Asp Ala Val Asp
 35 40 45

Leu Asp Leu Gly Phe Leu Phe Leu Asn Pro Ala Arg Tyr Ala Thr Leu
 50 55 60

10

ES 2 744 240 T3

Leu His Met Phe Asp Ser Leu Gly Val Asp Val Glu Thr Ser Asp Val
 65 70 75 80
 Ser Phe Ser Ile Ser His Asp Lys Gly Asn Asn Gly Tyr Glu Trp Cys
 85 90 95
 Ser Gln Tyr Gly Phe Ser Asn Tyr Phe Ala Gln Lys Lys Lys Leu Leu
 100 105 110
 Asn Pro Phe Asn Trp Gln Ser Leu Arg Glu Ile Ile Lys Phe Gly Asn
 115 120 125
 Asp Val Glu Ser Tyr Leu Gly Ser Leu Glu Asn Asn Pro Asp Ile Asp
 130 135 140
 Arg Thr Glu Thr Leu Gly Gln Phe Ile Asn Ser Lys Gly Tyr Ser Glu
 145 150 155 160
 Asn Phe Gln Asn Thr Tyr Leu Ala Pro Ile Cys Gly Ser Met Trp Ser
 165 170 175
 Ser Ser Lys Glu Asp Val Thr Ser Phe Ser Ala Phe Ser Ile Leu Ser
 180 185 190
 Phe Cys Arg Thr His His Leu Tyr Gln Leu Phe Gly Gln Ser Gln Trp
 195 200 205
 Leu Thr Ile Lys Gly His Ser His Phe Val Lys Arg Val Arg Glu Val
 210 215 220
 Leu Glu Thr Lys Gly Cys Gln Phe Lys Leu Gly Cys Glu Val Gln Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Pro Val Asp Asn Gly Thr Ala Met Val Cys Gly Asp Gly Phe
 245 250 255
 Gln Glu Thr Tyr Asn Gly Cys Ile Met Ala Val Asp Ala Pro Thr Ala
 260 265 270
 Leu Lys Leu Leu Gly Asn Gln Ala Thr Phe Glu Glu Thr Arg Val Leu
 275 280 285
 Gly Ala Phe Gln Tyr Ala Thr Ser Asp Ile Phe Leu His Gln Asp Ser
 290 295 300
 Thr Leu Met Pro Gln Asn Lys Ser Ala Trp Ser Ala Leu Asn Phe Leu
 305 310 315 320

ES 2 744 240 T3

Asn Ser Ser Lys Asn Asn Ala Phe Leu Thr Tyr Trp Leu Asn Ala Leu
 325 330 335
 Gln Asn Ile Gly Lys Thr Ser Glu Pro Phe Phe Val Thr Val Asn Pro
 340 345 350
 Asp His Thr Pro Lys Asn Thr Leu Leu Lys Trp Ser Thr Gly His Ala
 355 360 365
 Ile Pro Ser Val Ala Ala Ser Lys Ala Ser Leu Glu Leu Gly Gln Ile
 370 375 380
 Gln Gly Lys Arg Gly Ile Trp Phe Cys Gly Tyr Asp Phe Asn Gln Asp
 385 390 395 400
 Glu Leu Lys Ala Gly Met Asp Ala Ala His Gly Ile Leu Gly Lys His
 405 410 415
 Ser Ser Val Pro Pro Ser Pro Lys Asn Met Ser Pro Ser Leu Pro Lys
 420 425 430
 Asn Met Ser Pro Ser Phe Met Glu Thr Thr Ala Arg Leu Phe Val Thr
 435 440 445
 Lys Phe Phe Gln Gln Tyr Ile Ser Met Gly Cys Val Ile Phe Leu Glu
 450 455 460
 Glu Gly Gly Arg Ile Phe Thr Phe Lys Gly Asn Met Glu Lys Cys Pro
 465 470 475 480
 Leu Lys Thr Val Leu Lys Val His Asn Pro Gln Phe Tyr Trp Arg Ile
 485 490 495
 Met Lys Glu Ala Asp Ile Gly Leu Ala Asp Ala Tyr Ile His Gly Asp
 500 505 510
 Phe Ser Phe Leu Asp Glu Asn Glu Gly Leu Leu Asn Leu Phe Arg Ile
 515 520 525
 Leu Val Ala Asn Lys Glu Asn Ser Ala Ala Ser Gly Ser Thr Lys Arg
 530 535 540
 Arg Thr Trp Trp Ser Pro Ala Leu Leu Thr Ala Ser Ile Ser Ser Ala
 545 550 555 560
 Lys Tyr Phe Val Lys His Leu Leu Arg Gln Asn Thr Ile Thr Gln Ala

ES 2 744 240 T3

| 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Arg | Asn | Ile | Ser | Arg | His | Tyr | Asp | Leu | Ser | Asn | Glu | Leu | Phe | Ser |
| | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | |
| Leu | Tyr | Leu | Gly | Lys | Met | Met | Gln | Tyr | Ser | Ser | Gly | Val | Phe | Arg | Thr |
| | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | |
| Gly | Glu | Glu | His | Leu | Asp | Val | Ala | Gln | Arg | Arg | Lys | Ile | Ser | Ser | Leu |
| | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | |
| Ile | Glu | Lys | Thr | Arg | Ile | Glu | Lys | Trp | His | Glu | Val | Leu | Asp | Ile | Gly |
| 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 |
| Cys | Gly | Trp | Gly | Ser | Leu | Ala | Ile | Glu | Thr | Val | Lys | Arg | Thr | Gly | Cys |
| | | | | 645 | | | | | 650 | | | | | 655 | |
| Lys | Tyr | Thr | Gly | Ile | Thr | Leu | Ser | Glu | Gln | Gln | Leu | Lys | Tyr | Ala | Gln |
| | | | 660 | | | | | 665 | | | | | 670 | | |
| Glu | Lys | Val | Lys | Glu | Ala | Gly | Leu | Glu | Asp | Asn | Ile | Lys | Ile | Leu | Leu |
| | | 675 | | | | | 680 | | | | | 685 | | | |
| Cys | Asp | Tyr | Arg | Gln | Leu | Pro | Lys | Glu | His | Gln | Phe | Asp | Arg | Ile | Ile |
| | 690 | | | | | 695 | | | | | 700 | | | | |
| Ser | Val | Glu | Met | Val | Glu | His | Val | Gly | Glu | Glu | Tyr | Ile | Glu | Glu | Phe |
| 705 | | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 |
| Tyr | Arg | Cys | Cys | Asp | Gln | Leu | Leu | Lys | Glu | Asp | Gly | Leu | Phe | Val | Leu |
| | | | | 725 | | | | | 730 | | | | | 735 | |
| Gln | Phe | Ile | Ser | Ile | Pro | Glu | Glu | Leu | Ser | Lys | Glu | Ile | Gln | Gln | Thr |
| | | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | |
| Ala | Gly | Phe | Leu | Lys | Glu | Tyr | Ile | Phe | Pro | Gly | Gly | Thr | Leu | Leu | Ser |
| | | 755 | | | | | 760 | | | | | 765 | | | |
| Leu | Asp | Arg | Asn | Leu | Ser | Ala | Met | Ala | Ala | Ala | Thr | Arg | Phe | Ser | Val |
| | 770 | | | | | 775 | | | | | 780 | | | | |
| Glu | His | Val | Glu | Asn | Ile | Gly | Met | Ser | Tyr | Tyr | His | Thr | Leu | Arg | Trp |
| 785 | | | | | 790 | | | | | 795 | | | | | 800 |
| Trp | Arg | Lys | Leu | Phe | Leu | Lys | Asn | Thr | Ser | Lys | Val | Leu | Ala | Leu | Gly |
| | | | | 805 | | | | | 810 | | | | | 815 | |

ES 2 744 240 T3

Phe Asp Glu Lys Phe Met Arg Thr Trp Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Cys
820 825 830

Ala Ala Gly Phe Lys Thr Gly Thr Leu Ile Asp Tyr Gln Val Val Phe
835 840 845

Ser Arg Ala Gly Asn Phe Gly Thr Leu Gly Asp Pro Tyr Lys Gly Phe
850 855 860

Pro Ser Ala Tyr Ser Phe Met Asp Asp
865 870

<210> 23

<211> 1407

5 <212> ADN

<213> Gossypium hirsutum

<400> 23

ES 2 744 240 T3

atggatgctg cacatggtat cttgggaaag cattcttctg ttccgcccag tccaaagaat 60
atgtcacccct ctttaccaaa gaatatgtca ccctctttca tggaaacaac ggcacgcctc 120
tttgttacca aattctttca acaatatata tctatgggct gcgtaatttt tttagaggaa 180
ggaggcagaa ttttcacttt caaaggaaac atggaaaagt gtcctcttaa aacagttctg 240
aaagtgcata atcctcagtt ttactggagg atcatgaaag aagctgatat aggccttgca 300
gacgcatata tccatggaga tttttctttt cttgatgaaa atgaaggcct tcttaatctt 360
ttccggattc ttgttgccaa taaagagaac tcagctgcct cagggctcgac taaaagaag 420
acttggtygt cgcctgctct gttaacagct agtatatcat ctgccaaagta ttttgtgaag 480
catctcttaa gacaaaatac tattacacaa gctcgtagga acatttctcg tcattatgat 540
ctgagtaatg aacttttctc tctatacttg ggcaaatga tgcaatactc ttctggagt 600
tttaggacag gagaagaaca tttggacggt gcacagcgaa gaaaaatcag ttctctaatt 660
gagaaaacaa ggatagagaa atggcatgaa gttctagaca ttgggtgcgg ttggggaagc 720
ttagctattg aaactgtgaa aagaacagga tgcaaatata ctggcatcac tctatcagaa 780
cagcaactga aatatgctca agaaaaagtg aaggaagctg gactcgagga taacatcaaa 840
atacttctct gtgactatcg ccagttacct aaggaacacc aatttgacag aatcatatct 900
gtagagatgg tagaacatgt tggatgaagaa tatattgagg aattttacag atgctgtgat 960
caattactga aagaagatgg acttttcggt cttcagttca tatctatccc agaggagctt 1020
tccaaagaaa tccagcaaac agctggtttt ctttaaggaat atatattccc tggatggaacc 1080
ctgctttctt tggataggaa tttatcagcc atggctgctg caacaagatt cagtgtggag 1140
catgtggaaa acataggaat gagttattac cacacactga gatggtggag aaaacttttc 1200
ctgaaaaaca caagcaaagt tctggctttg gggttcgacg agaagttcat gcggacatgg 1260
gaatactatt tcgattactg tgctgctggt ttaagacag gaacccttat agattaccag 1320
gttgatattt ctcgagccgg taatttcggt aacttggag atccatacaa aggtttccct 1380
tctgcatatt ccttcatgga tgattga 1407

<210> 24
<211> 2622
<212> ADN
<213> Gossypium hirsutum
<400> 24

5

ES 2 744 240 T3

| | |
|--|------|
| atggaagtgg ccgatgatcgg aggtgggata aaagggttgc tttcggccta cgtactggtc | 60 |
| aaagccggcg tggacgtggt ggtttacgag aaagaagaac aattaggcgg ccatgcaaag | 120 |
| actgttaact tgcagccgt tgatttagac cttggcttct tgtttctcaa tccagcaaga | 180 |
| tatgcaacac tattgcatat gttcgacagc cttgggtgtg atgtagaac atccgatgtt | 240 |
| tcattctcta taagccatga caaaggcaac aatggctatg aatgggtgcag ccaatatgga | 300 |
| ttttccaatt actttgctca aaagaagaaa ctggtgaacc ctttcaattg gcaaagcctc | 360 |
| agagagatca tcaaattcgg caatgatgtc gaaagttacc ttggatcact tgagaacaac | 420 |
| ccagacattg atcgtactga gaccttggga cagtttataa actcaaaggg ctactctgaa | 480 |
| aattttcaaa acacttatct ggctcctata tgtggttcaa tgtggtcaag ctccaaggaa | 540 |
| gatgttacga gcttttcagc tttttccatc ctttcatttt gccgtactca tcatttgtac | 600 |
| cagctatttg ggcagtcaca gtgggtgact atcaaagggc actcacattt tgttaaaagg | 660 |
| gtagggaag tgctggagac taaaggttgt caatttaaac tcggttgtga agtacaatct | 720 |
| gttttgcccg ttgataatgg taccgccatg gtctgtggag atggtttcca agaaacttac | 780 |
| aatggatgca taatggctgt tgatgctccc actgccctaa aattattagg aaaccaagca | 840 |
| acatttgaag aaacaagagt actgggtgct ttccaatatg ctaccagtga tattttcctt | 900 |
| caccaggaca gtactttaat gccacaaaac aaatcagctt ggagtgcatt gaattttctc | 960 |
| aatagtagca aaaataatgc attcttaaca tactggctca atgcactaca gaatattggg | 1020 |
| aaaacaagtg agccattttt tgtgactgtc aatccagacc ataccccgaa gaatacctta | 1080 |
| cttaagtggg caaccggcca tgcaattccc tctgttgctg catcaaaagc ttcacttgag | 1140 |
| cttggtcaga ttcagggaaa gagaggaatc tggttctgtg gctatgactt caatcaggat | 1200 |
| gaactaaagg ctggtatgga tgctgcacat ggtatcttgg gaaagcattc ttctgttccg | 1260 |
| cccagtccaa agaatatgtc accctcttta ccaaagaata tgtcaccctc tttcatggaa | 1320 |
| acaacggcac gcctctttgt taccaaattc tttcaacaat atatatctat gggctgcgta | 1380 |
| atthtttttag aggaaggagg cagaattttc actttcaaag gaaacatgga aaagtgcct | 1440 |
| cttaaaacag ttctgaaagt gcataatcct cagttttact ggaggatcat gaaagaagct | 1500 |

ES 2 744 240 T3

gatataggcc ttgcagacgc atatatccat ggagatTTTT cttttcttga tgaaaatgaa 1560
 ggccttctta atcttttccg gattcttggt gccaaataag agaactcagc tgcctcaggg 1620
 tcgactaaaa gaaggacttg gtggtcgcct gctctgtaa cagctagtat atcatctgcc 1680
 aagtattttg tgaagcatct cttaagacaa aatactatta cacaagctcg taggaacatt 1740
 tctcgtcatt atgatctgag taatgaactt ttctctctat acttgggcaa aatgatgcaa 1800
 tactcttctg gagtctttag gacaggagaa gaacatttgg acgttgcaca gcgaagaaaa 1860
 atcagttctc taattgagaa aacaaggata gagaaatggc atgaagttct agacattggg 1920
 tgcggttggg gaagcttagc tattgaaact gtgaaaagaa caggatgcaa atatactggc 1980
 atcactctat cagaacagca actgaaatat gctcaagaaa aagtgaagga agctggactc 2040
 gaggataaca tcaaaatact tctctgtgac tatcgccagt tacctaagga acaccaatTT 2100
 gacagaatca tatctgtaga gatggtagaa catggttggtg aagaatatat tgaggaatTT 2160
 tacagatgct gtgatcaatt actgaaagaa gatggacttt tcgttcttca gttcatatct 2220
 atcccagagg agcttttcaa agaaatccag caaacagctg gttttcttaa ggaatatata 2280
 ttccctggtg gaaccctgct ttctttggat aggaatttat cagccatggc tgctgcaaca 2340
 agattcagtg tggagcatgt ggaaaacata ggaatgagtt attaccacac actgagatgg 2400
 tggagaaaaac ttttctgaa aaacacaagc aaagttctgg ctttgggggtt cgacgagaag 2460
 ttcattgcgga catgggaata ctatttcgat tactgtgctg ctggttttta gacaggaacc 2520
 cttatagatt accaggttgt attttctcga gccggtaatt tcggtacact tggagatcca 2580
 tacaaggtt tcccttctgc atattccttc atggatgatt ga 2622

<210> 25
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 25

Met Ser Ser Ser Cys Ile Glu Glu Val Ser Val Pro Asp Asp Asn Trp
 1 5 10 15
 Tyr Arg Ile Ala Asn Glu Leu Leu Ser Arg Ala Gly Ile Ala Ile Asn
 20 25 30
 Gly Ser Ala Pro Ala Asp Ile Arg Val Lys Asn Pro Asp Phe Phe Lys
 35 40 45
 Arg Val Leu Gln Glu Gly Ser Leu Gly Leu Gly Glu Ser Tyr Met Asp
 50 55 60

10

ES 2 744 240 T3

Gly Trp Trp Glu Cys Asp Arg Leu Asp Met Phe Phe Ser Lys Val Leu
65 70 75 80

Arg Ala Gly Leu Glu Asn Gln Leu Pro His His Phe Lys Asp Thr Leu
85 90 95

Arg Ile Ala Gly Ala Arg Leu Phe Asn Leu Gln Ser Lys Lys Arg Ala
100 105 110

Trp Ile Val Gly Lys Glu His Tyr Asp Leu Gly Asn Asp Leu Phe Ser
115 120 125

Arg Met Leu Asp Pro Phe Met Gln Tyr Ser Cys Ala Tyr Trp Lys Asp
130 135 140

Ala Asp Asn Leu Glu Ser Ala Gln Gln Ala Lys Leu Lys Met Ile Cys
145 150 155 160

Glu Lys Leu Gln Leu Lys Pro Gly Met Arg Val Leu Asp Ile Gly Cys
165 170 175

Gly Trp Gly Gly Leu Ala His Tyr Met Ala Ser Asn Tyr Asp Val Ser
180 185 190

Val Val Gly Val Thr Ile Ser Ala Glu Gln Gln Lys Met Ala Gln Glu
195 200 205

Arg Cys Glu Gly Leu Asp Val Thr Ile Leu Leu Gln Asp Tyr Arg Asp
210 215 220

Leu Asn Asp Gln Phe Asp Arg Ile Val Ser Val Gly Met Phe Glu His
225 230 235 240

Val Gly Pro Lys Asn Tyr Asp Thr Tyr Phe Ala Val Val Asp Arg Asn
245 250 255

Leu Lys Pro Glu Gly Ile Phe Leu Leu His Thr Ile Gly Ser Lys Lys
260 265 270

Thr Asp Leu Asn Val Asp Pro Trp Ile Asn Lys Tyr Ile Phe Pro Asn
275 280 285

Gly Cys Leu Pro Ser Val Arg Gln Ile Ala Gln Ser Ser Glu Pro His
290 295 300

Phe Val Met Glu Asp Trp His Asn Phe Gly Ala Asp Tyr Asp Thr Thr
305 310 315 320

ES 2 744 240 T3

Leu Met Ala Trp Tyr Glu Arg Phe Leu Ala Ala Trp Pro Glu Ile Ala
 325 330 335

Asp Asn Tyr Ser Glu Arg Phe Lys Arg Met Phe Thr Tyr Tyr Leu Asn
 340 345 350

Ala Cys Ala Gly Ala Phe Arg Ala Arg Asp Ile Gln Leu Trp Gln Val
 355 360 365

Val Phe Ser Arg Gly Val Glu Asn Gly Leu Arg Val
 370 375 380

<210> 26
 <211> 1140
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Marco de lectura abierto de CPFAS de E. Coli con codones optimizados para la expresión en plantas

<400> 26

```

atgtcatcct cctgcatcga agaagtttct gttccagacg ataactggta cagaattgcc      60
aacgaattat tgtccagagc tggatttgct attaacggtt ctgctccagc tgatattaga      120
gttaagaacc cagacttctt caagagagta ttgcaagaag gttctttggg tttgggtgaa      180
tcttatatgg atggttggtg ggaatgcat agattggata tgttcttctc aaaggttttg      240
agagcgggtt tggaaaatca attgccacat catttcaagg acaccttgag aattgctggt      300
gctagattat tcaacttgca atctaagaag agagcctgga tcgttggtaa agaacattac      360
gatttgggta acgacttggt ctccagaatg ttggatccat tcatgcaata ctcttgctgct      420
tactggaagg atgctgataa tttggaatct gctcaacaag ccaagttgaa gatgatattgc      480
gaaaagttgc aattgaagcc aggtatgaga gttttggata ttggttggtg ttggggtggt      540
ttggctcatt atatggcttc taactacgat gtttccggtg ttggtgttac catttctgct      600
gaacaacaaa agatggctca agaaagatgc gaaggtttgg atgttaccat cttggtgcaa      660
gattacagag acttgaacga ccaattcgat agaatcggtt ccggttggtat gttcgaacat      720
gttgggtccaa agaactacga tacttacttc gctgttgctg acagaaattt gaagccagaa      780
ggtatthttct tgttgcatc catcgggtcc aaaaagaccg atttgaatgt agatccttgg      840
atcaacaagt acatctttcc aaatggttgc ttgccatccg ttagacaaat tgctcaatct      900
tctgaaccac acttcggtat ggaagattgg cataatthtcg gtgctgatta cgatacaact      960
ttgatggctt ggtacgaaag atthttggct gcttggccag aaattgctga taattactcc     1020
gaaagattca agagaatggt cacctactac ttgaatgctt gtgctggtgc thttagagcc     1080
agagatattc aattgtggca agttgthttc tccagaggtg ttgaaaacgg tttgagagtt     1140
    
```

<210> 27
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Virus de la mancha anular del cimbido

ES 2 744 240 T3

<400> 27

```

Met Glu Arg Ala Ile Gln Gly Ser Asp Val Arg Glu Gln Ala Asp Ser
1           5           10           15

Glu Cys Trp Asp Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ser Pro Phe Lys Leu
           20           25           30

Pro Asp Glu Ser Pro Ser Leu His Glu Trp Arg Leu His His Ser Glu
           35           40           45

Glu Ser Glu Asn Lys Asp Asn Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Ser
           50           55           60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Gly Ala Glu
65           70           75           80

Thr Ser Leu His Arg Ala Leu Gly Ser Trp Glu Arg Asp Ser Val Asn
           85           90           95

Asp Ala Ala Ser Arg Phe Leu Gly Leu Ser Gln Ile Gly Cys Thr Tyr
           100          105          110

Ser Ile Arg Phe Arg Gly Thr Arg Leu Thr Leu Ser Gly Gly Ser Gly
           115          120          125

Thr Leu Gln Arg Leu Ile Glu Met Ala Ile Arg Thr Lys Arg Thr Met
130          135          140

Leu Gln Pro Thr Pro Ser Glu Arg Glu Gly Asn Val Ser Arg Arg Arg
145          150          155          160

Pro Glu Gly Thr Glu Ala Phe Lys Glu Glu Ser Glu
           165          170

```

5

<210> 28
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Virus de la mancha necrótica del pelargonio

10

<400> 28

ES 2 744 240 T3

Met Glu Arg Ala Val Gln Gly Gly Asp Ala Arg Glu Gln Ala Asn Ser
 1 5 10 15

Glu Arg Trp Asp Gly Gly Cys Gly Gly Thr Ile Thr Pro Phe Lys Leu
 20 25 30

Ser Asp Glu Ser Pro Ser Leu His Glu Trp Arg Leu His His Ser Glu
 35 40 45

Glu Gly Glu Asp Gln Asp His Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Ser
 50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Gly Gly Thr Glu
 65 70 75 80

Thr Ser Leu His Arg Ala Leu Gly Ser Trp Glu Arg Asn Thr Val Asn
 85 90 95

Asn Ala Ala Ser Arg Phe Leu Gly Phe Gly Gln Ile Gly Cys Thr Tyr
 100 105 110

Ser Ile Arg Phe Arg Gly Ser Cys Leu Thr Ile Ser Gly Gly Ser Arg
 115 120 125

Thr Leu Gln Arg Leu Ile Glu Met Ala Ile Arg Thr Lys Cys Thr Val
 130 135 140

Leu Gln Leu Thr Pro Ser Glu Val Glu Gly Asn Val Ser Gly Gly Ser
 145 150 155 160

Pro Glu Gly Ile Glu Ala Phe Glu Lys Glu Ser Glu
 165 170

<210> 29

<211> 172

5 <212> PRT

<213> Tombusvirus del río Havel

<400> 29

ES 2 744 240 T3

Met Glu Gly Ala Ile Gln Gly Ser Asp Ala Arg Glu Gln Ala Asn Ser
 1 5 10 15

Glu Arg Trp Asp Gly Gly Cys Gly Gly Thr Ile Thr Pro Phe Lys Leu
 20 25 30

Pro Asp Glu Ser Pro Gly Leu His Glu Trp Arg Leu His Asn Ser Glu
 35 40 45

Glu Ser Glu Asp Lys Asp His Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Gly
 50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Gly Thr Glu
 65 70 75 80

Ala Ser Leu His Arg Ala Leu Gly Ser Trp Glu Arg Gly Ser Val Asn
 85 90 95

Asp Ala Ala Ser Arg Phe Leu Gly Leu Gly Gln Val Gly Cys Thr Tyr
 100 105 110

Ser Ile Arg Phe Arg Gly Ser Cys Leu Thr Leu Ser Gly Gly Ser Arg
 115 120 125

Thr Leu Gln Arg Leu Ile Glu Met Ala Ile Arg Thr Lys Arg Thr Met
 130 135 140

Leu Gln Leu Thr Pro Ser Glu Val Glu Gly Asn Val Ser Arg Gly Arg
 145 150 155 160

Pro Glu Gly Ala Lys Ala Phe Glu Lys Glu Ser Glu
 165 170

<210> 30

<211> 173

5 <212> PRT

<213> Virus de la necrosis del pepino

<400> 30

ES 2 744 240 T3

Met Glu Arg Ala Ile Gln Gly Ser Asp Ala Arg Glu Gln Ala Tyr Ser
 1 5 10 15

Glu Arg Trp Asp Gly Gly Cys Gly Gly Thr Ile Thr Pro Phe Lys Leu
 20 25 30

Pro Asp Glu Ser Pro Ser Leu His Glu Trp Arg Leu His Asn Ser Glu
 35 40 45

Glu Ser Glu Asp Lys Asp His Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Ser
 50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Gly Thr Glu
 65 70 75 80

Thr Ser Leu His Arg Ala Leu Gly Ser Trp Glu Arg Ser Thr Val Asn
 85 90 95

Asp Ala Ala Ser Arg Phe Leu Gly Phe Gly Gln Ile Gly Cys Thr Tyr
 100 105 110

Ser Ile Arg Phe Arg Gly Ser Cys Leu Thr Leu Ser Gly Gly Ser Arg
 115 120 125

Thr Leu Gln Arg Leu Ile Glu Met Ala Ile Arg Thr Lys Tyr Thr Met
 130 135 140

Leu Gln Leu Thr Pro Ser Glu Val Glu Gly Asp Val Ser Arg Gly Cys
 145 150 155 160

Pro Glu Gly Ser Glu Ala Phe Lys Thr Lys Glu Ser Glu
 165 170

<210> 31

<211> 172

5 <212> PRT

<213> Virus latente de las vides de Argelia

<400> 31

ES 2 744 240 T3

Met Glu Arg Thr Ile Gln Gly Ser Asp Val Arg Glu Gln Ala Asn Ser
 1 5 10 15

Glu Arg Trp Asp Gly Gly Cys Gly Ser Thr Ile Thr Pro Phe Lys Leu
 20 25 30

Pro Asp Glu Ser Pro Ser Leu Tyr Glu Trp Arg Leu His Asn Ser Glu
 35 40 45

Glu Ser Glu Asp Lys Asp His Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Cys
 50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Gly Thr Glu
 65 70 75 80

Ala Ser Leu His Arg Ala Leu Gly Ser Trp Glu Arg Ser Ser Val Asn
 85 90 95

Asp Ala Ala Ser Arg Phe Leu Gly Leu Gly Gln Ile Gly Cys Thr Tyr
 100 105 110

Ser Ile Arg Phe Arg Gly Ser Cys Leu Thr Leu Ser Gly Gly Ser Arg
 115 120 125

Thr Leu Gln Arg Leu Ile Glu Met Ala Ile Arg Thr Lys Cys Thr Met
 130 135 140

Leu Gln Leu Ala Pro Cys Glu Val Glu Ser Asp Val Ser Arg Arg Cys
 145 150 155 160

Pro Glu Gly Thr Glu Ala Phe Glu Lys Glu Ser Glu
 165 170

<210> 32
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Virus latente de la pera
 <400> 32

5

ES 2 744 240 T3

Met Glu Arg Ala Ile Gln Gly Ser Asp Ala Arg Glu Gln Ala Tyr Ser
1 5 10 15

Glu Arg Trp Asp Gly Gly Cys Gly Gly Thr Ile Thr Pro Phe Lys Leu
20 25 30

Pro Asp Glu Ser Pro Ser Leu Ile Glu Trp Arg Leu His Asn Ser Glu
35 40 45

Glu Ser Glu Asp Lys Asp Asn Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Ser
50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Gly Thr Glu
65 70 75 80

Ala Ser Leu His Arg Ala Leu Gly Ser Trp Glu Arg Asp Thr Val Asn
85 90 95

Asn Ala Ala Ser Arg Phe Leu Gly Phe Gly Gln Ile Gly Cys Thr Tyr
100 105 110

Cys Ile Arg Phe Arg Gly Ser Cys Leu Thr Ile Ser Gly Gly Ser Arg
115 120 125

Thr Leu Gln Arg Leu Ile Glu Met Ala Ile Arg Thr Lys Arg Thr Met
130 135 140

Leu Gln Leu Thr Pro Cys Glu Val Glu Gly Asn Val Ser Arg Gly Ser
145 150 155 160

Pro Glu Gly Thr Glu Ala Phe Lys Glu Glu Ser Glu
165 170

<210> 33

<211> 172

5 <212> PRT

<213> Virus de las manchas necróticas de Lisianthus

<400> 33

ES 2 744 240 T3

Met Glu Arg Ala Ile Gln Gly Ser Asp Ala Arg Glu Gln Ala Tyr Ser
 1 5 10 15

Glu Arg Trp Asp Gly Gly Cys Gly Gly Thr Ile Thr Pro Phe Lys Leu
 20 25 30

Pro Asp Glu Ser Pro Ser Leu Ile Glu Trp Arg Leu His Asn Ser Glu
 35 40 45

Glu Ser Glu Asp Lys Asp Asn Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Ser
 50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Gly Thr Glu
 65 70 75 80

Ala Ser Leu His Arg Ala Leu Gly Ser Trp Glu Arg Asp Thr Val Asn
 85 90 95

Asp Ala Ala Ser Arg Phe Leu Gly Phe Gly Gln Ile Gly Cys Thr Tyr
 100 105 110

Cys Ile Arg Phe Arg Gly Ser Cys Leu Thr Ile Ser Gly Gly Ser Arg
 115 120 125

Thr Leu Gln Arg Leu Ile Glu Met Ala Ile Arg Thr Lys Arg Thr Met
 130 135 140

Leu Gln Leu Ala Pro Cys Glu Val Glu Gly Asn Val Ser Arg Gly Ser
 145 150 155 160

Pro Glu Gly Thr Glu Ala Phe Lys Glu Glu Ser Glu
 165 170

<210> 34
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Virus del amarilleo necrótico de la lechuga
 <400> 34

Met Glu Arg Ala Ile Gln Gly Asn Asp Ala Arg Glu Gln Ala Asn Ser
 1 5 10 15

Glu Arg Trp Asn Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ser Pro Phe Lys Phe
 20 25 30

Pro Asp Glu Ser Pro Ser Trp Thr Glu Trp Arg Leu His Asn Asp Glu
 35 40 45

5

10

ES 2 744 240 T3

Thr Asn Ser Asn Gln Asp Asn Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Gly
 50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Gly Thr Glu
 65 70 75 80

Ala Ser Leu His Arg Val Leu Gly Ser Trp Thr Gly Asp Ser Val Asn
 85 90 95

Tyr Ala Ala Ser Arg Phe Phe Gly Ile Asn Gln Ile Gly Cys Thr Tyr
 100 105 110

Ser Ile Arg Phe Arg Gly Val Ser Val Thr Ile Ser Gly Gly Ser Arg
 115 120 125

Ala Leu Gln His Leu Cys Glu Met Ala Val Arg Ala Lys Gln Glu Leu
 130 135 140

Leu Gln Leu Thr Pro Val Glu Val Glu Ser Asn Val Ser Arg Arg Cys
 145 150 155 160

Pro Glu Gly Phe Glu Ala Phe Glu Lys Glu Ser Glu
 165 170

<210> 35

<211> 172

5 <212> PRT

<213> Virus del rizado moteado de la alcachofa

<400> 35

Met Glu Arg Val Ile Gln Gly Asn Asp Ala Arg Glu Gln Ala Asn Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Trp Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Thr Ser Pro Phe Lys Leu
 20 25 30

Pro Asp Glu Ser Pro Ser Trp Thr Glu Trp Arg Ile His Asn Asp Glu
 35 40 45

Thr Asp Ser Asn Lys Asp Asn Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Gly
 50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Arg Thr Glu
 65 70 75 80

Thr Ser Leu His Arg Val Leu Gly Ser Trp Thr Gly Asp Ser Val Asn
 85 90 95

10

ES 2 744 240 T3

Tyr Ala Ala Ser Arg Phe Leu Gly Val Asn Gln Ile Gly Cys Thr Tyr
 100 105 110

Ser Ile Arg Phe Arg Gly Val Ser Val Thr Ile Ser Gly Gly Ser Arg
 115 120 125

Thr Leu Gln His Leu Cys Glu Met Ala Ile Arg Ser Lys Gln Glu Leu
 130 135 140

Leu Gln Leu Ala Pro Val Glu Val Glu Ser Asn Val Ser Arg Gly Arg
 145 150 155 160

Pro Glu Gly Ala Glu Ala Phe Lys Glu Glu Ser Glu
 165 170

<210> 36

<211> 172

5 <212> PRT

<213> Virus de la mancha anular del clavel italiano

<400> 36

Met Glu Arg Ala Ile Gln Gly Asn Gln Ala Arg Glu Gln Ala Asn Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Trp Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Thr Ser Pro Phe Lys Leu
 20 25 30

Ser Asp Glu Ser Pro Ser Trp Thr Glu Trp Arg Leu His Asn Asp Glu
 35 40 45

Thr Asn Ser Asn Gln Asp Asn Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Gly
 50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Arg Thr Glu
 65 70 75 80

Thr Ser Leu His Arg Val Leu Gly Ser Trp Thr Gly Asn Ser Val Asn
 85 90 95

Tyr Ala Ala Ser Arg Phe Phe Gly Val Asn Gln Ile Gly Cys Thr Tyr
 100 105 110

Ser Ile Arg Phe Arg Gly Val Ser Val Thr Ile Ser Gly Gly Ser Arg
 115 120 125

Thr Leu Gln His Leu Cys Glu Met Ala Ile Arg Ser Lys Gln Glu Leu
 130 135 140

10

ES 2 744 240 T3

Leu Gln Leu Thr Pro Val Glu Val Glu Ser Asn Val Ser Arg Gly Cys
 145 150 155 160

Pro Glu Gly Ala Glu Ala Phe Glu Glu Glu Ser Glu
 165 170

5 <210> 37
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Virus del rayado necrótico del maíz
 <400> 37

Met Glu Arg Ala Ile Gln Gly Ser Asp Ala Trp Gln Gln Thr Gly Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Arg Val Gly Gly Cys Gly Asp Ser Phe Ala Pro Phe Gln Leu
 20 25 30

Pro Asp Glu Ser Pro Thr Ser Asp Glu Trp Arg Leu His His Asp Ala
 35 40 45

Tyr Asp Pro Asp Thr Asp Cys Pro Leu Gly Phe Lys Glu Phe Trp Ser
 50 55 60

Val Gly Lys Ala Ile Ser Lys Arg Tyr His Arg Tyr Asp Trp Lys Glu
 65 70 75 80

Ala Ser Leu Asp Arg Ala Leu Gly Ser Trp Gln Gly Asp Lys Val Ile
 85 90 95

Thr Glu Ala Ser Arg Phe Leu Gly Val Asp Gln Val Ser Cys Thr Tyr
 100 105 110

Ser Ile Arg Val Arg Gly Val Ser Ile Thr Leu Ser Gly Gly Ser Arg
 115 120 125

Ala Leu Leu Arg Leu Val Ser Met Ala Asp Arg Ile Lys Arg Ser Glu
 130 135 140

Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ala Val Glu Ser Val Val Ser Arg Gly Cys
 145 150 155 160

10 Pro Glu Glu Glu Thr Pro Lys Glu Ser Glu
 165 170

15 <210> 38
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Virus del enanismo clorótico de la sandía
 <400> 38

ES 2 744 240 T3

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Asp Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
 1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Val Lys Tyr Leu Gln Ala Val Glu Ser Thr Tyr
 20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Glu Leu Ile Arg Asp Leu Ile Leu Val
 35 40 45

Leu Arg Ala Arg Asp Tyr Gly Glu Ala Asn Arg Arg Tyr Ser His Phe
 50 55 60

His Ser Arg Phe Glu Gly Ser Ser Lys Thr Glu Leu Arg Gln Pro Leu
 65 70 75 80

His Glu Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Gly His Lys Gln Ala Ser
 85 90 95

Thr Met Gly Gln Gln Ala His Val Ser Lys Ala Gln Asp Val Gln Asp
 100 105 110

Val Ser Lys Pro Arg Cys Pro
 115

5 <210> 39
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Virus del arrugamiento amarillo de la oca

10 <400> 39

Met Trp Asp Pro Leu Val Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
 1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ala Leu Glu Asp Thr Tyr
 20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly Ser Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
 35 40 45

Ile Arg Ala Lys Asn Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn Phe Phe
 50 55 60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Ser Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Leu
 65 70 75 80

ES 2 744 240 T3

His Glu Pro Cys Asn Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Thr Ser
85 90 95

Val Met Asp Ser Pro Ala Asn Val Gln Lys Ala Gln Asn Val Pro Asp
100 105 110

Val Gln Lys Pro
115

5 <210> 40
<211> 116
<212> PRT
<213> Virus del rizado de la hoja de la oca

<400> 40

Met Trp Asp Pro Leu Val Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ala Leu Glu Asp Thr Tyr
20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly Ser Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
35 40 45

Ile Arg Ala Lys Asn Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn Tyr Phe
50 55 60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Ser Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Leu
65 70 75 80

His Glu Pro Cys Asn Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Thr Ser
85 90 95

Val Met Asp Leu Pro Ala Asn Val Gln Lys Ala Gln Asn Val Pro Asp
100 105 110

10 Val Gln Lys Pro
115

15 <210> 41
<211> 116
<212> PRT
<213> Togovirus del rizado de la hoja del tomate

<400> 41

ES 2 744 240 T3

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Asp Ser Val His Gly Phe
 1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Gly Ile Lys Tyr Leu Gln Leu Leu Glu Glu Glu Tyr
 20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Val Arg Asp Leu Ile Ser Val
 35 40 45

Val Arg Ala Lys Asn Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn Asn Phe
 50 55 60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ala Ser Thr Ala Glu Leu Arg Gln Pro Leu
 65 70 75 80

Arg Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Ser
 85 90 95

Phe Val Asp Val Pro Ala His Val Ser Gln Ala Lys Asn Val Gln Asp
 100 105 110

Val Gln Asn Ser
 115

- <210> 42
- <211> 116
- 5 <212> PRT
- <213> Virus del rizado de la hoja de Ageratum de Camerún
- <400> 42

ES 2 744 240 T3

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Asp Ser Val His Gly Phe
 1 5 10 15
 Arg Cys Met Leu Gly Ile Lys Tyr Leu Gln Leu Leu Glu Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
 35 40 45
 Ile Arg Ala Lys Asn Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn Asn Phe
 50 55 60
 His Ala Arg Leu Glu Gly Ala Ser Thr Ser Glu Leu Arg Gln Pro Leu
 65 70 75 80
 His Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Ser
 85 90 95
 Phe Met Asp Val Pro Ala His Val Pro Lys Ala Gln Asn Val Pro Asp
 100 105 110
 Val Gln Asn Pro

115

5 <210> 43
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Virus del mosaico de la yuca Malawi de África Oriental
 <400> 43

ES 2 744 240 T3

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Asp Ser Val His Gly Phe
 1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ala Leu Glu Glu Thr Tyr
 20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Val Arg Asp Leu Ile Cys Val
 35 40 45

Ile Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
 50 55 60

His Ser Arg Leu Glu Gly Ala Ser Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Val
 65 70 75 80

Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Thr
 85 90 95

Ile Met Asp Val Pro Ala His Val Ser Lys Ala Gln Asn Val Gln Asn
 100 105 110

Val Gln Lys Ser
 115

<210> 44
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Virus del mosaico de la yuca de Sudáfrica

5

<400> 44

Met Trp Asp Pro Leu Val Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
 1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ala Val Glu Glu Thr Tyr
 20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Val Arg Asp Leu Ile Cys Val
 35 40 45

Leu Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
 50 55 60

10

ES 2 744 240 T3

His Ser Arg Leu Glu Gly Ala Thr Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Val
65 70 75 80

Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Pro
85 90 95

Ile Met Asp Val Thr Ala His Val Ser Lys Ala Gln Asn Val Gln Asn
100 105 110

Val Gln Lys Ser
115

<210> 45

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Virus del rizado de la hoja del tomate de Madagascar

<400> 45

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Asp Ser Val His Gly Phe
1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Val Lys Tyr Leu Gln Ala Val Glu Glu Thr Tyr
20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
35 40 45

Ile Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
50 55 60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Ser Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
65 70 75 80

Tyr Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Ser
85 90 95

Val Met Asp Leu Pro Ala His Val Pro Lys Ala Gln Asp Val Gln Asn
100 105 110

Val Gln Lys Pro
115

10

<210> 46

<211> 116

<212> PRT

15 <213> Virus del rizado de la hoja del tomate de Zimababue

<400> 46

ES 2 744 240 T3

```

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
1           5           10           15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ala Val Glu Glu Ser Tyr
          20           25           30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Cys Val
          35           40           45

Ile Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
          50           55           60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Ser Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
65           70           75           80

Tyr Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Thr Thr
          85           90           95

Val Val Asp Leu Pro Ala Gln Leu Pro Lys Ala Gln Asn Val Pro Asp
          100          105          110

Val Gln Lys Ser
          115

```

<210> 47
 <211> 116
 5 <212> PRT
 <213> Begomovirus del tomate

<400> 47

```

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Asp Ser Val His Gly Phe
1           5           10           15

Arg Cys Met Leu Ala Val Lys Tyr Leu Gln Ala Val Glu Glu Thr Tyr
          20           25           30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
          35           40           45

Ile Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
          50           55           60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Ser Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
65           70           75           80

Tyr Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Ser
          85           90           95

```

10

ES 2 744 240 T3

Val Met Asp Leu Pro Ala His Val Pro Lys Ala Gln Asp Val Gln Asn
 100 105 110

Val Gln Lys Pro
 115

- <210> 48
- <211> 116
- 5 <212> PRT
- <213> Virus del rizado de la hoja del tomate de Namakely
- <400> 48

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Asp Ser Val His Gly Phe
 1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ala Ile Glu Gln Thr Tyr
 20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
 35 40 45

Val Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
 50 55 60

His Ala Arg Phe Glu Gly Ala Ser Lys Val Glu Leu Arg Gln Pro Val
 65 70 75 80

Tyr Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Thr Ser
 85 90 95

Val Met Asp Val Gln Ala His Val Ser Lys Ala Gln Asp Val Gln Asn
 100 105 110

Val Gln Lys Pro
 115

- 10
- <210> 49
- <211> 116
- <212> PRT
- 15 <213> Virus de las venas amarillas del pimiento
- <400> 49

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Asp Ser Val His Gly Phe
 1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ala Val Glu Asp Ser Tyr
 20 25 30

ES 2 744 240 T3

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Cys Val
 35 40 45

Ile Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
 50 55 60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Ser Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
 65 70 75 80

Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Ser
 85 90 95

Ile Met Asp Leu Pro Ala His Val Ser Lys Ala Gln Asp Val Gln Asn
 100 105 110

Val Gln Lys Pro
 115

<210> 50

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Virus del rizado de la hoja del tomate de Sudán

<400> 50

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
 1 5 10 15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ala Val Glu Glu Thr Tyr
 20 25 30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
 35 40 45

Val Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Ser His Phe
 50 55 60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Pro Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
 65 70 75 80

Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Thr
 85 90 95

Ile Met Asp Val Gln Ala His Val Ser Lys Ala Gln Asn Ile Gln Asn
 100 105 110

Val Ser Lys Ser
 115

10

<210> 51

<211> 116

ES 2 744 240 T3

<212> PRT

<213> Virus del rizado de la hoja del tomate de Omán

<400> 51

5

```

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
1           5           10           15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ala Val Glu Gln Thr Tyr
20           25           30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
35           40           45

Ile Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Ser Arg Arg Tyr Asn His Phe
50           55           60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Pro Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
65           70           75

Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Thr
85           90           95

Val Met Asp Val Gln Ala His Val Pro Lys Ala Gln Asn Ile Gln Asn
100          105          110

Val Ser Lys Pro
115
    
```

<210> 52

<211> 913

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica un miARN dirigido a la fitoeno desaturasa de A. thaliana

15

<400> 52

```

actagtgatt tcacttttgt tctcctcctc cctttttttc ttttcaggat tcttcttttc      60
tatgttttat ctttcataat agatctgata attttgattt ttcactatat atattatggt      120
taatactagt agctttttca tttcaagttt tatccttcca ttggttcttt ctgagtcaaa      180
ttgtctcctg tttcgaacca tatataagtt ttcaatgggt ttgtattaac tcaagtattc      240
aacattatgt ctctcttttt cttgcttgga tctctaagtc tgttcatatt ttaaagcata      300
ggtttagggt agatgcatgt aactgccaat taaaagaagg tcaagagttt tttgattgta      360
tgaatatatg agttagtcaa agcagatcca cacgattata tagaaaaaca aaggaagaag      420
    
```

ES 2 744 240 T3

aagaggggtgc aacttaaggc taggattgga gggtttagca ggggtgaagta aagctgctaa 480
gctatggatc ccataagcct tatcaaattc aatataattg atgataaggt tttttttatg 540
gatgccatat ctcaggagct ttcacttacc cctttaatgg cttcactctt ctatcctaga 600
attaagttgc accatctctc catccctatc tctctctctc tctatcttta gttcttttaa 660
gaatgacttt tcattttttg tgttgtctgt tgcaggtgta taaacatgga tgatggatct 720
tgagtaggat tttttathtt attttcttgt gacatatatg caatttttat ggtttgtact 780
ttgtathttcc attagtttcc tacttttcag ttatgtatca ttgttaattc taatgtttga 840
agacatttag agtttatact tctctaaatt actttttcga ctcaataaag tcgtttaagt 900
gtctgggttc gaa 913

<210> 53
<211> 913
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica un miARN dirigido a la FAD2 de A. thaliana

10

<400> 53

actagtgatt tcacttttgt tctcctctc cctttttttc ttttcaggat tcttcttttc 60
tatgttttat ctttcataat agatctgata attttgattt ttcactatat atattatggg 120
taataactagt agctttttca tttcaagttt tatccttcca ttggttcttt ctgagtcaaa 180
ttgtctcctg tttcgaacca tatataagtt ttcaatgggt ttgtattaac tcaagtattc 240
aacattatgt ctctcttttt cttgcttggg tctctaattg tgttcatatt ttaaagcata 300
ggtttagggt agatgcatgt aactgccaat taaaagaagg tcaagagttt tttgattgta 360
tgaatatatg agtttagtcaa agcagatcca cacgattata tagaaaaaca aaggaagaag 420
aagaggggtgc aacttaaggc taggattgga gggtttagca ggggtgaagta aagctgctaa 480
gctatggatc ccataagcct tatcaaattc aatataattg atgataaggt tttttttatg 540
gatgccatat ctcaggagct ttcacttacc cctttaatgg cttcactctt ctatcctaga 600
attaagttgc accatctctc catccctatc tctctctctc tctatcttta gttcttttaa 660
gaatgacttt tcattttttg tgttgtctgt tgcaggtgta taaacatgga tgatggatct 720
tgagtaggat tttttathtt attttcttgt gacatatatg caatttttat ggtttgtact 780
ttgtathttcc attagtttcc tacttttcag ttatgtatca ttgttaattc taatgtttga 840
agacatttag agtttatact tctctaaatt actttttcga ctcaataaag tcgtttaagt 900
gtctgggttc gaa 913

REIVINDICACIONES

1. Una célula eucariota que comprende,

- 5 i) un primer polinucleótido de interés que codifica un ARN diana,
 ii) un primer polinucleótido exógeno que codifica una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc) que comprende una primera secuencia de nucleótidos que es complementaria con una región del ARN diana codificada por el primer polinucleótido de interés,
 10 iii) un segundo polinucleótido exógeno que codifica un polipéptido supresor del silenciamiento,
 iv) un tercer polinucleótido exógeno, diferente del primer y segundo polinucleótidos exógenos y del primer polinucleótido de interés, que codifica un ARN de interés,
 v) un nivel reducido del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o una cantidad reducida de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno, y
 15 vi) un nivel aumentado del ARN de interés y/o la cantidad de proteína codificada por el ARN de interés cuando se compara con una célula correspondiente que tiene el tercer polinucleótido exógeno y que carece del segundo polinucleótido exógeno,

20 en el que cada polinucleótido exógeno está unido operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión del polinucleótido en la célula, y en el que la célula comprende el polipéptido supresor del silenciamiento y la molécula de ARNdc o un producto de ARN procesado del mismo que comprende la primera secuencia de nucleótidos y es capaz de reducir en la célula el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno, y en el que el supresor del silenciamiento se une preferentemente a una
 25 molécula de ARN de doble cadena que tiene extremos 5' protuberantes en relación con una molécula de ARN de doble cadena correspondiente que tiene extremos romos.

30 2. La célula eucariota de la reivindicación 1, en la que el primer nucleótido de interés es un gen endógeno de la célula o un gen de un patógeno de la célula.

3. La célula eucariota de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el primer y segundo polinucleótidos exógenos forman parte de la misma construcción de ADN, que preferentemente está integrada en el genoma de la célula.

35 4. La célula eucariota de la reivindicación 3, en la que el primer, segundo y tercer polinucleótidos exógenos forman parte de la misma construcción de ADN, que preferentemente está integrada en el genoma de la célula.

40 5. La célula eucariota de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que al menos el segundo polinucleótido exógeno está integrado en el genoma de la célula.

45 6. La célula eucariota de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la célula comprende al menos un 25 %, preferentemente al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de reducción en el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno.

50 7. La célula eucariota de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el supresor del silenciamiento comprende aminoácidos que tienen una secuencia como se proporciona en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 o 38 a 51, un fragmento biológicamente activo del mismo, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 30 % idéntica a una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1, o 38 a 51.

55 8. La célula eucariota de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la molécula de ARNdc o un producto de ARN procesado de la misma, comprende al menos 19 nucleótidos consecutivos, que es al menos 95 % idéntico al complemento de una región del ARN diana, y en el que la región del ARN diana está i) dentro de una región no traducida 5' del ARN diana, ii) dentro de la mitad 5' del ARN diana, iii) dentro de un marco de lectura abierto que codifica proteínas del ARN diana, iv) dentro de la mitad 3' del ARN diana, o v) dentro de una región 3' no traducida del ARN diana.

60 9. La célula eucariota de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la molécula de ARNdc es un precursor de microARN (miARN) y/o en el que el producto de ARN procesado del mismo es un miARN.

65 10. La célula eucariota de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la célula es una célula vegetal, una célula fúngica tal como una célula de levadura, una célula de un animal invertebrado o una célula de un animal vertebrado.

11. Una planta o una parte de una planta que comprende,

- i) un primer polinucleótido de interés que codifica un ARN diana,
 ii) un primer polinucleótido exógeno que codifica una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc) que comprende una primera secuencia de nucleótidos que es complementaria con una región del ARN diana codificada por el primer polinucleótido de interés,
 5 iii) un segundo polinucleótido exógeno que codifica un polipéptido supresor del silenciamiento,
 iv) un tercer polinucleótido exógeno, diferente del primer y segundo polinucleótidos exógenos y del primer polinucleótido de interés, que codifica un ARN de interés,
 v) un nivel reducido del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o una cantidad reducida de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una planta o parte de la planta correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno, y
 10 vi) un nivel aumentado del ARN de interés y/o la cantidad de proteína codificada por el ARN de interés cuando se compara con una planta o parte de la planta correspondiente que tiene el tercer polinucleótido exógeno y que carece del segundo polinucleótido exógeno,
- 15 en el que cada polinucleótido exógeno está unido operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión del polinucleótido en una célula vegetal, en el que la planta o parte de la planta comprende el polipéptido supresor del silenciamiento y la molécula de ARNdc o un producto de ARN procesado del mismo que comprende la primera secuencia de nucleótidos y es capaz de reducir en la célula el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una
 20 célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno, y en el que el supresor del silenciamiento se une preferentemente a una molécula de ARN de doble cadena que tiene extremos 5' protuberantes en relación con una molécula de ARN de doble cadena correspondiente que tiene extremos romos.
12. La planta o parte de la planta de la reivindicación 11, que se **caracteriza por** una o más de las características de las reivindicaciones 2 a 10.
13. Un proceso para la producción de una célula eucariota de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo el método
- 30 a) introducir en una célula eucariota uno o más de
- i) un primer polinucleótido exógeno que codifica una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc) que comprende una primera secuencia de nucleótidos que es complementaria con una región de un ARN diana codificada por un primer polinucleótido de interés en la célula eucariota,
 35 ii) un segundo polinucleótido exógeno que codifica un polipéptido supresor del silenciamiento,
 iii) un tercer polinucleótido exógeno, diferente del primer y segundo polinucleótidos exógenos y del primer polinucleótido de interés, que codifica un ARN de interés, de tal modo que la célula comprende el primer, segundo y tercer polinucleótidos exógenos, y
- 40 b) expresar el primero, segundo y tercer polinucleótidos exógenos en la célula, en el que la célula comprende
- v) un nivel reducido del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o una cantidad reducida de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno, y
 45 vi) un nivel aumentado del ARN de interés y/o la cantidad de proteína codificada por el ARN de interés cuando se compara con una célula correspondiente que tiene el tercer polinucleótido exógeno y que carece del segundo polinucleótido exógeno,y
- en el que cada polinucleótido exógeno está unido operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión del polinucleótido en la célula, y en el que la célula comprende el polipéptido supresor del silenciamiento y la molécula de ARNdc o un producto de ARN procesado del mismo que comprende la primera secuencia de nucleótidos y es capaz de reducir en la célula el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno, y en el que el supresor del silenciamiento se une preferentemente a una
 50 molécula de ARN de doble cadena que tiene extremos 5' protuberantes en relación con una molécula de ARN de doble cadena correspondiente que tiene extremos romos.
14. El proceso de la reivindicación 13, en el que la célula comprende al menos el primero, segundo y tercer polinucleótidos exógenos, y el proceso comprende además una o más etapas seleccionadas de:
- 60 c) analizar la célula para detectar la presencia de uno o más del primer, segundo y tercer polinucleótidos exógenos, el primer polinucleótido de interés o el ARN de interés, y
 d) analizar la célula para detectar una reducción en el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de la proteína codificada por el ARN diana,
 65 e) analizar la célula para determinar el nivel de ARN de interés y/o la cantidad de proteína codificada por el ARN de interés, si está presente, y

5 f) seleccionar una célula que tiene un mayor nivel de ARN de interés y/o una mayor cantidad de proteína codificada por el ARN de interés cuando se compara con una célula correspondiente que tiene el tercer polinucleótido exógeno y que carece del segundo polinucleótido exógeno, y/o que tiene un nivel reducido del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o una cantidad reducida de la proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno.

15. Un proceso para seleccionar una célula eucariota con un nivel deseado de silenciamiento de un polinucleótido de interés, comprendiendo el proceso;

- 10 i) obtener una o más células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,
 ii) analizar la célula o células para determinar uno o más de (a) el nivel del ARN codificado por el polinucleótido de interés, (b) la cantidad de la proteína codificada por el ARN diana, (c) el nivel de la molécula de ARNdc o un producto de ARN procesado de la misma el cual comprende la primera secuencia de nucleótidos y que es capaz de reducir en la célula el nivel del ARN diana codificado por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de una proteína codificada por el ARN diana en comparación con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido exógeno y (d) un fenotipo determinado por el polinucleótido de interés,
 15 iii) si la célula o células no tienen el nivel deseado de silenciamiento del polinucleótido de interés, sustituir uno o ambos polinucleótidos exógenos con un polinucleótido o polinucleótidos alternativos y analizar la célula o células resultantes para determinar el nivel deseado de silenciamiento,
 20 iv) si es necesario, repetir la etapa iii) hasta obtener el nivel deseado de silenciamiento del polinucleótido de interés, y
 v) seleccionar una célula con el nivel deseado de silenciamiento,

25 en el que cada polinucleótido exógeno está unido operativamente a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de los polinucleótidos en la célula.

16. Una construcción de ADN que comprende,

- 30 i) un primer polinucleótido que codifica una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc) que comprende una primera secuencia de nucleótidos que es complementaria con una región de un ARN diana codificada por un primer polinucleótido de interés, y
 ii) un segundo polinucleótido que codifica un supresor del silenciamiento,

35 en el que cada polinucleótido está operativamente unido a uno o más promotores que son capaces de dirigir la expresión de los polinucleótidos en la célula, y el primer y segundo polinucleótidos son exógenos a la célula, en el que la construcción de ADN comprende adicionalmente un tercer polinucleótido, diferente del primer o segundo polinucleótido o primer polinucleótido de interés, de modo que en una célula eucariota que comprende la construcción de ADN, la molécula de ARNdc o un producto de ARN procesado de la misma, que comprende la primera secuencia de nucleótidos es capaz de reducir el nivel del ARN diana codificado por el primer por el primer polinucleótido de interés y/o la cantidad de una proteína codificada por el ARN diana cuando se compara con una célula correspondiente que carece del primer polinucleótido, y la expresión del tercer polinucleótido aumenta cuando se compara con una célula correspondiente que tiene el tercer polinucleótido y que carece del segundo polinucleótido, y en el que el supresor del silenciamiento se une preferentemente a una molécula de ARN de doble cadena que tiene extremos 5' protuberantes en relación con una molécula de ARN de doble cadena correspondiente que tiene extremos romos.

45 17. Un método para fabricar un producto, comprendiendo el método uno o más de obtener, hacer crecer, cultivar o poner en cultivo una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo un organismo no humano transgénico la célula o una parte de la misma y procesar la célula, organismo o parte para producir el producto.

50

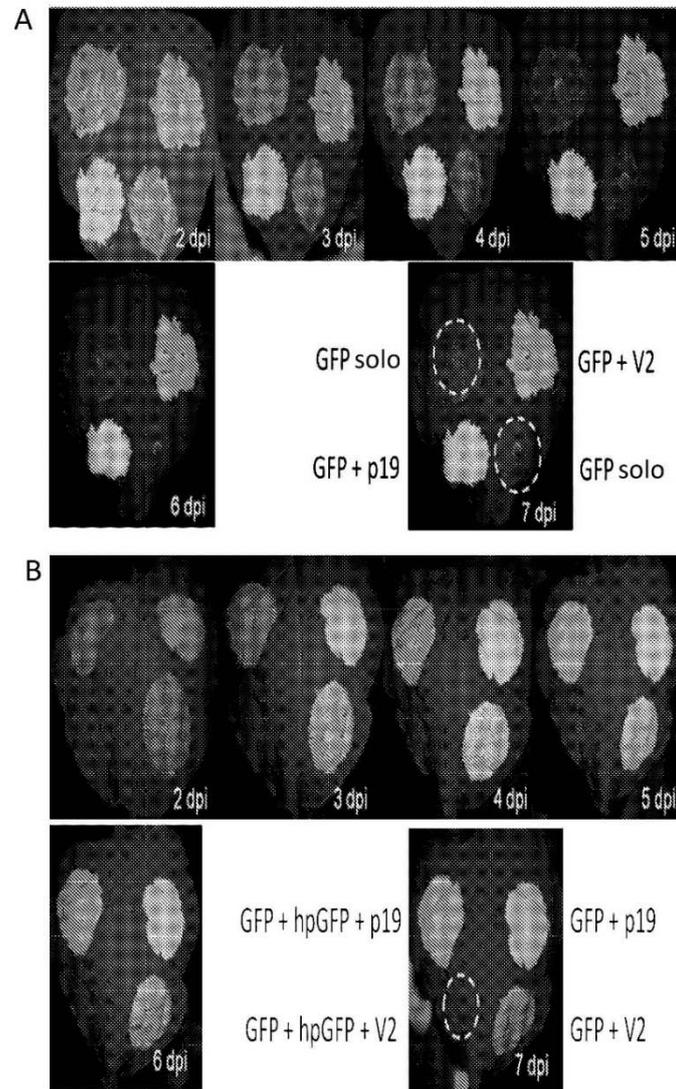


Figura 1

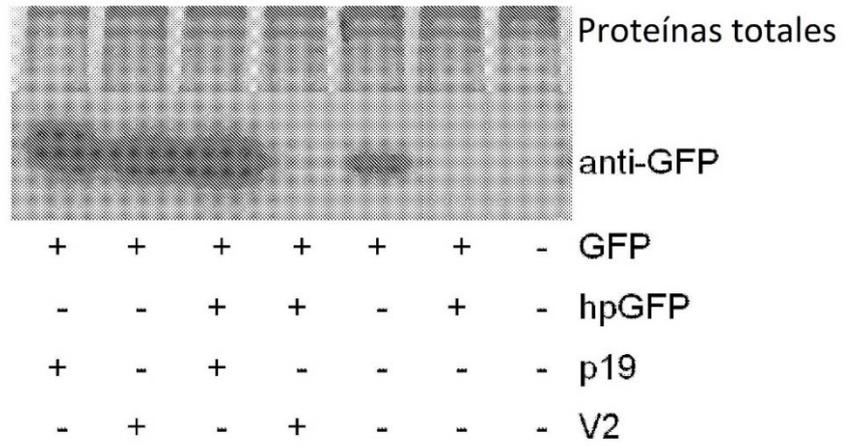


Figura 2

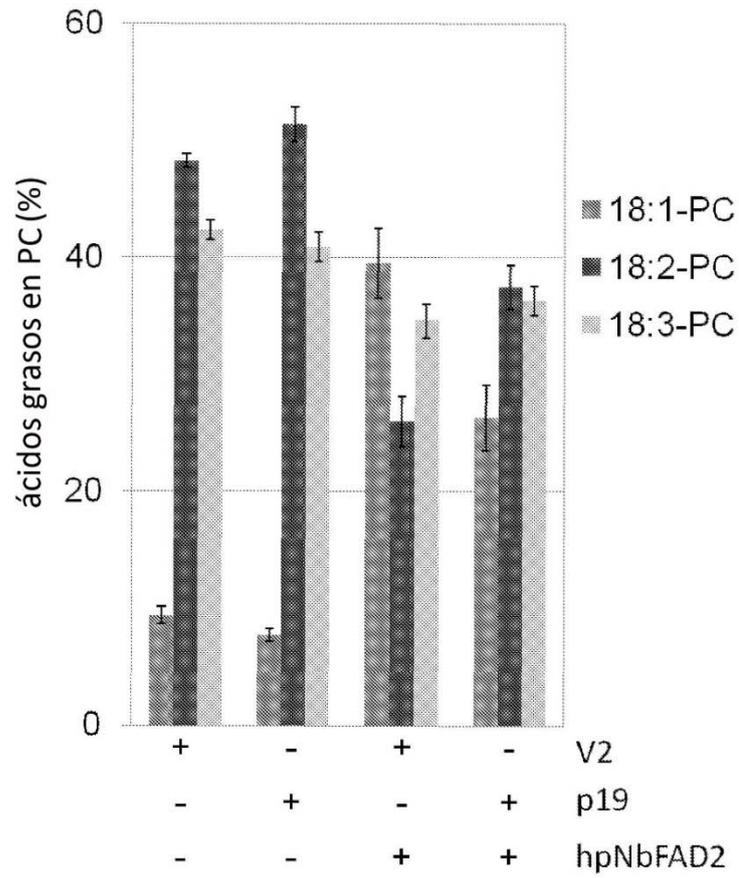


Figura 3

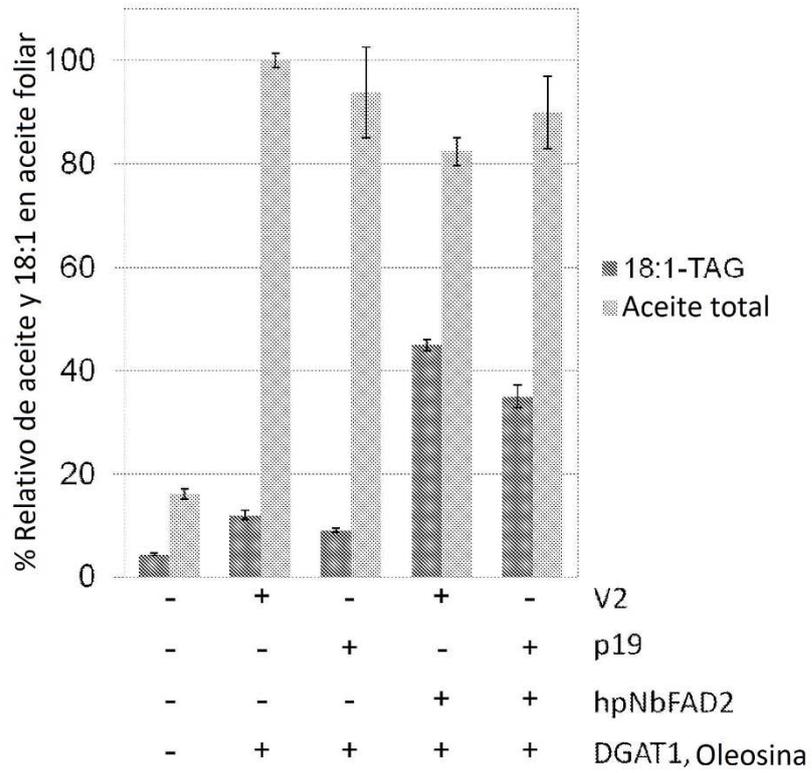


Figura 4

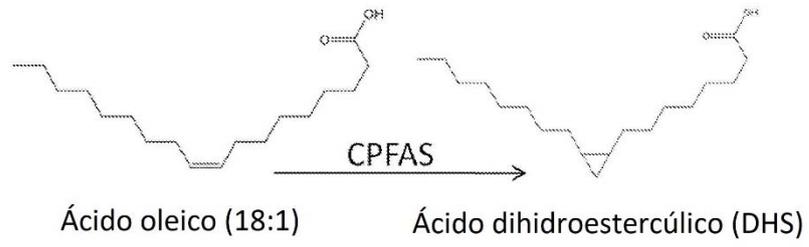


Figura 5

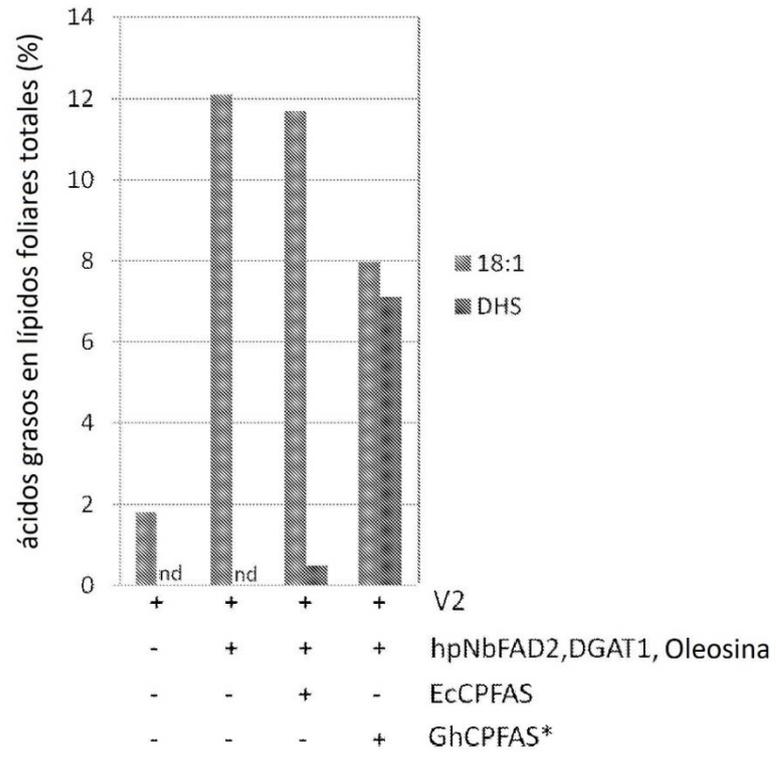


Figura 6

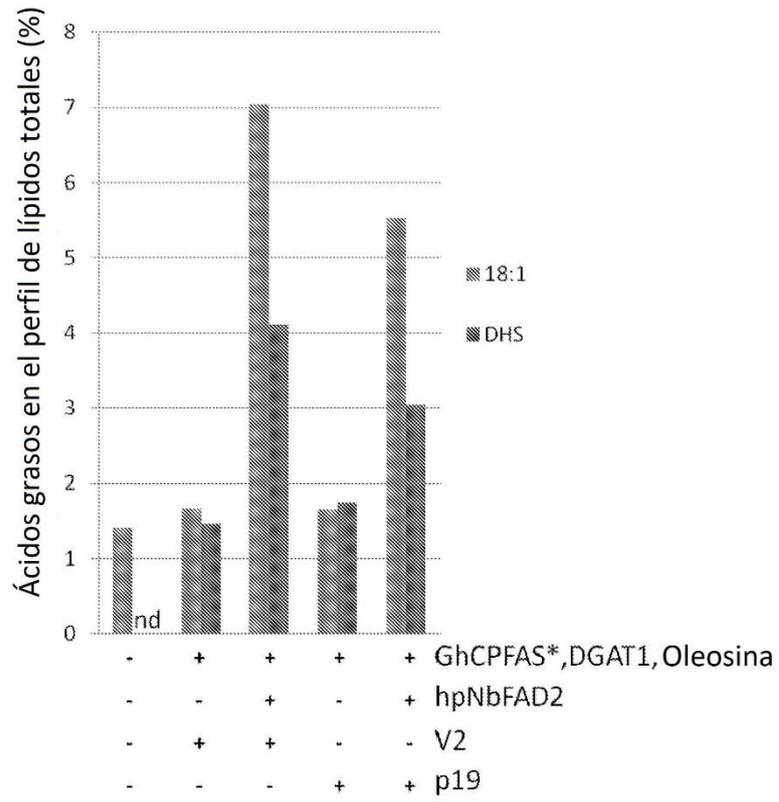


Figura 7

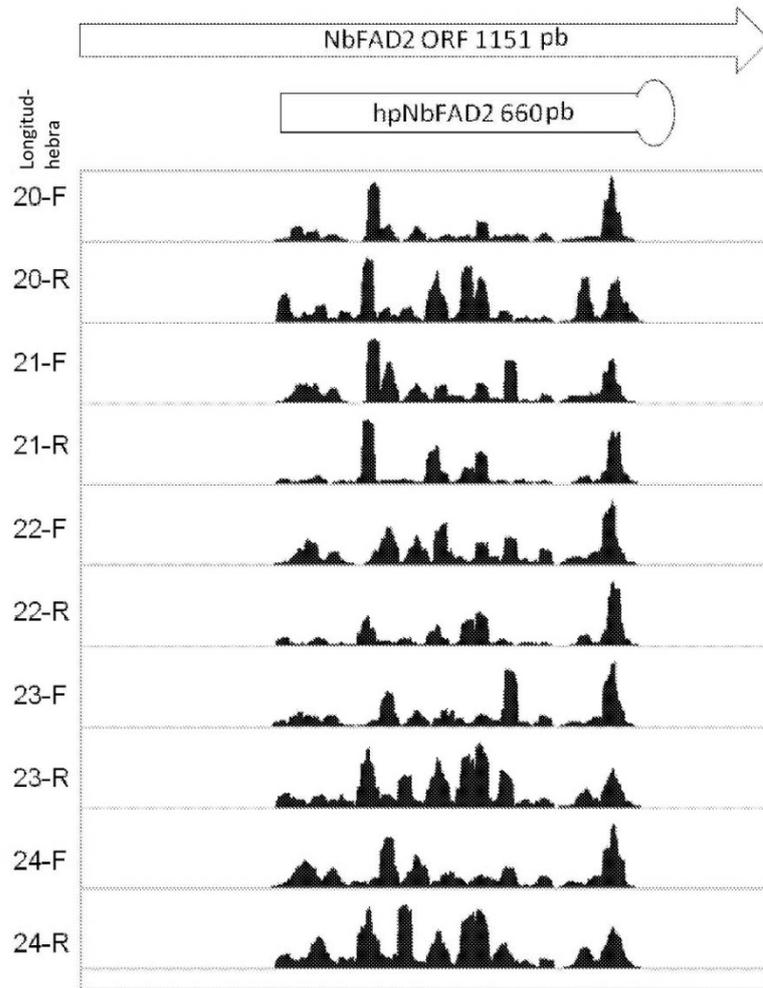


Figura 8

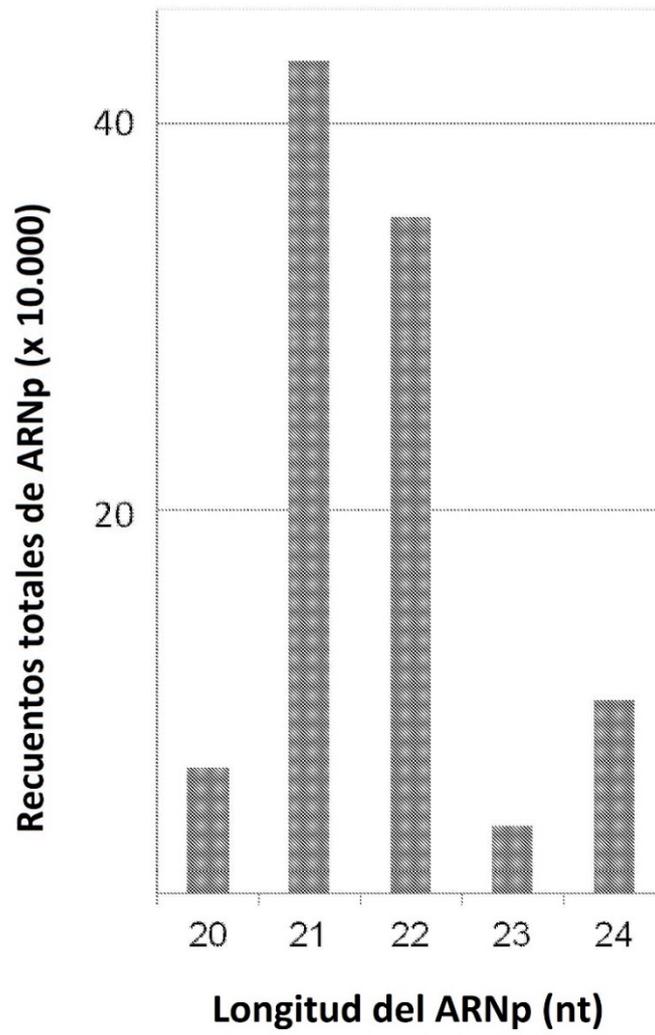


Figura 9

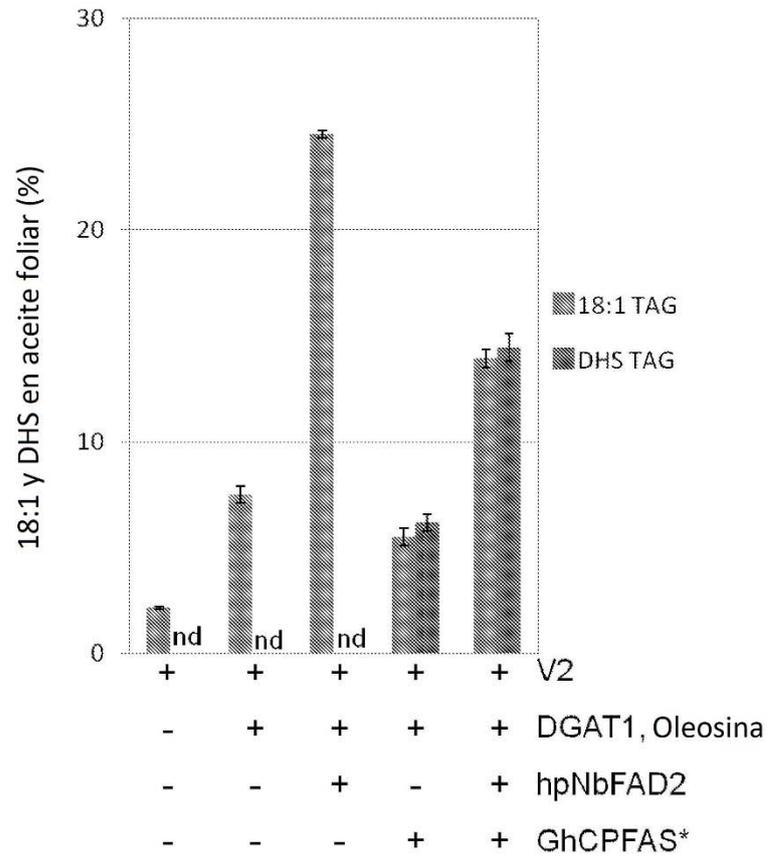


Figura 10

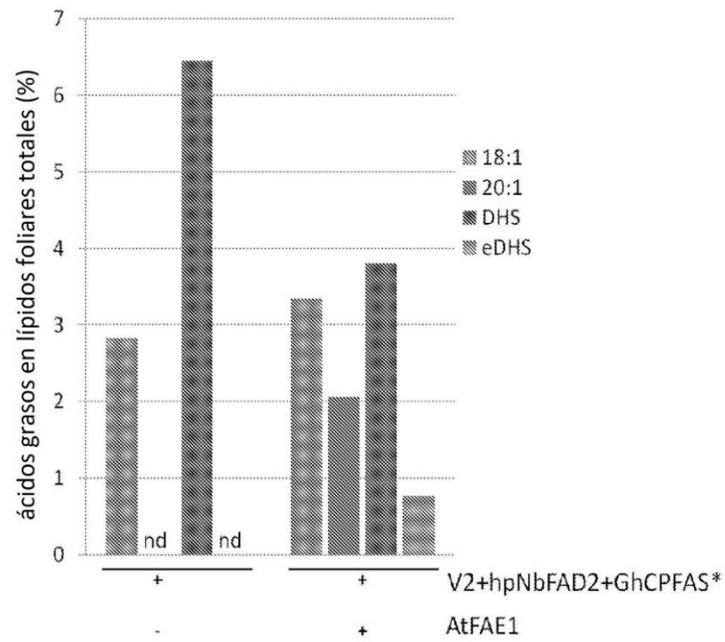


Figura 11

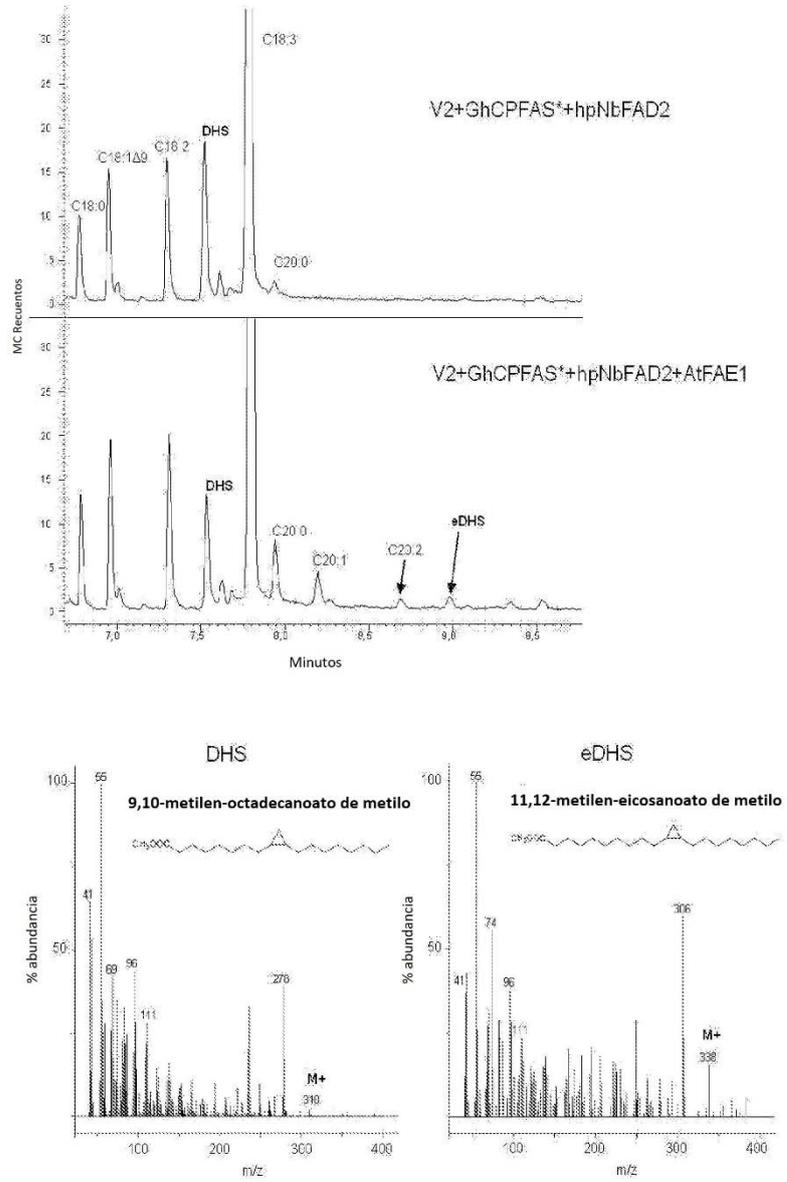


Figura 12